Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Die Wirkung der Zytostatika Cyclophosphamid (Endoxan) und Vinblastinsulfat (Velbe) auf die Doppelbrechung neutrophiler Granulozyten des Menschen nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rainer Lemke
aus Gerstetten

1968

9750

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0028

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Die Wirkung der Zytostatika Cyclophosphamid (Endoxan) und Vinblastinsulfat (Velbe) auf die Doppelbrechung neutrophiler Granulozyten des Menschen nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rainer Lemke
aus Gerstetten

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. W. Graumann

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.P. Missmahl
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Herrn Professor Mißmahl möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A Einleitung 1

B Material und Methode

Besprechung der benutzten Zytostatika 3
Endoxan (Cyclophosphamid) 3
Velbe (Vinblastinsulfat) 5
Besprechung des Untersuchungsmaterials 6
Blutausstriche von 11 Patienten 6
In Vitro-Versuche mit :
a) Endoxan 7
b) Velbe 8
c) KCN 8
d) Hydrocortison 9
e) Tuschespeicherung 9
Kritik an der Methode 11

C Ergebnisse bei den mit Zytostatika behandelten Patienten 12
a) Die Kurven der mit Velbe behandelten Patienten 13
b) Besprechung der Ergebnisse der mit Velbe behandelten Patienten 18
c) Kritik an den Ergebnissen der mit Velbe behandelten Patienten 20
d) Die Kurven der 7 mit Endoxan behandelten Patienten 21
e) Besprechung der Ergebnisse der mit Endoxan behandelten Patienten 29
f) Kritik an den Ergebnissen der mit Endoxan behandelten Patienten 31
g) Vergleich der Zunahme der Doppelbrechung bei den mit Endoxan-und Velbe behandelten Patienten 32

Seite

D Ergebnisse der in Vitro-Versuche 37

a) Endoxan 37

b) Velbe 40

c) KCN 43

d) Hydrocortison 46

e) Tuschespeicherung 47

E Diskussion 53

a) Der Einfluß von Velbe und Endoxan auf die doppelbrechenden Strukturen der peripheren neutrophilen Granulozyten

b) Der Einfluß der Zytostatika auf das Knochenmark 55

c) Besprechung eines Zusammenhanges zwischen der Zunahme der Doppelbrechung im Protoplasma der neutrophilen Granulozyten mit einer Schädigung dieser Zellen anhand der in vitro-Versuche 58

d) Diskussion der Lysosomennatur der mit grob und "verklumpt" bezeichneten doppelbrechenden Strukturen 59

F Zusammenfassung 64

G Literaturverzeichnis 66

A Einleitung

Bei polarisationsoptischen Untersuchungen von supravital mit Toluidinblau gefärbtem Blut wurden von M i s s m a h l im Protoplasma der granulierten Leukozyten, der Lymphozyten und der Monozyten hell aufleuchtende doppelbrechende Strukturen gefunden. Es handelt sich bei diesen Strukturen um Teile des Protoplasmas, die feinstrukturell aus übereinanderliegenden Kugelschalen aufgebaut sind. Der Farbstoff ist in diese mit der längeren Achse seiner Teilchen senkrecht zu den Radien stehend eingelagert. Nach Größe und Stärke der Anisotropie werden die Teilchen in kleine, mittlere und große eingeteilt. Die Anzahl und Verteilung dieser doppelbrechenden Strukturen kann von Zellart zu Zellart unterschiedlich sein. (29)
Bei den neutrophilen Granulozyten des Menschen liessen sich folgende Merkmale erkennen :

1) Für den gesunden Menschen konnten Normwerte aufgestellt werden. Es überwiegen dort die feinen und mittleren Strukturen.(39)

2) Bei akuten Entzündungen, Fieber und nach Injektion pyrogener Stoffe konnte eine Abnahme der feinen und mittleren Strukturen zugunsten der großen beobachtet werden.(18;39)

3) Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Doppelbrechung und der Kernsegmentzahl der neutrophilen Leukozyten insofern, als die großen Strukturen mit steigender Anzahl der Kernsegmente abnehmen.(39)

4) Mit zunehmender Färbedauer nehmen die feinen und mittleren Strukturen zugunsten der großen ab.(29;39)

In dieser Arbeit soll nun folgendes untersucht werden :

1) Bei elf mit Zytostatika behandelten Patienten wird nachgeprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Behandlung und dem Grad der Doppelbrechung der neutrophilen Granulozyten gefunden werden kann.

2) Inwiefern sich in vitro die Doppelbrechung durch Zugabe verschiedener Substanzen beeinflussen läßt.

3) Ob ein Zusammenhang zwischen der Phagozytose von Tuschepartikeln und den doppelbrechenden Strukturen besteht.

4) Die Zugehörigkeit der doppelbrechenden Strukturen zu den als Lysosomen bezeichneten Zellorganellen wird diskutiert.

B Material und Methode

Besprechung der benutzten Zytostatica

Cyclophosphamid (Endoxan)

Cyclophosphamid, ein Abkömmling des Stickstofflosts, bekannt unter dem Handelsnamen Endoxan, gehört zu den alkylierenden Zytostatika. Für ihre Wirkungsweise wird als Angriffsort die Interphase des Zellzyklus angenommen, deswegen werden sie als Ruhekerngifte den Mitosegiften gegenübergestellt.(35) Endoxan ist ein relativ günstiges Zytostatikum, da sein therapeutischer und sein toxischer Bereich nicht so nahe beieinanderliegen, wie bei den meisten übrigen Zytostatika.(10) Die Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Leukopenie sind im allgemeinen nur flüchtig. Bei den sieben hier zu besprechenden Patienten wurde entsprechend dem Vorschlag D r u c k r e y ' s (10) Endoxan in Stössen mit Abständen von 9-16 Tagen angewandt. Die Dosis betrug 25-30 mg pro kg Körpergewicht. Als Kriterium für die Gabe eines weiteren Stosses galt ein Wiederanstieg der Leukozyten über 2500.

Vorteile der Stoßtherapie :(10)
1) Die leukotoxische Wirkung ist bei chronischer und massierter Gabe gleich schnell reversibel.

2) Die allgemeintoxische Wirkung kumuliert stärker als die therapeutische Wirkung, daher können bei täglichen Gaben nur geringe Mengen gegeben werden.

3) Bei chronischer Gabe besteht die Gefahr einer Resistenzentwicklung des Tumors, bei massiver Einzeldosierung wurde eine solche nicht festgestellt.

In letzter Zeit konnte durch B o c k et.al.(2) gezeigt werden, daß die Vorteile der Stoßtherapie, die D r u c k r e y im Tierversuch gefunden hat, sich nur bedingt auf den Menschen übertragen lassen. Lediglich beim Bronchialkarzinom zeigte sich eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit bei der Stoßtherapie. Bei den anderen Tumorarten ließ sich die Überlebenszeit bei der Stoß-

therapie gegenüber der täglichen Endoxangabe nicht verlängern; dazu müssen bei der Stoßtherapie mehr subjektive Unpäßlichkeiten, mehr Leukopenien unter 2000 und andere objektive Nebenwirkungen als bei der kontinuierlichen Gabe von etwa täglich 200 mg intravenös inkauf genommen werden.

Endoxan wird in inaktiver Form appliziert. Die Wirkform entsteht fast ausschliesslich in der Leber,(14) möglicherweise gibt es auch eine geringe intrazelluläre Aktivierung in allen übrigen Geweben.(21) Auf Zellkulturen hat Endoxan in inaktiver Form erst bei sehr massiver Dosierung einen hemmenden Einfluß. Bei Zugabe von Leberschnitten zu den Kulturen stellt sich sehr schnell ein zytostatischer Effekt ein.(24)

Im Serum und Aszites von Tumorratten wurde schon 15-20 Minuten nach der Injektion von Endoxan in inaktiver Form das Maximum der Wirkform erreicht; diese blieb etwa zwei Stunden lang konstant und sank dann stetig. Nach vierundzwanzig Stunden war keine Aktivität mehr nachweisbar.(3) Beim Menschen werden innerhalb von drei Tagen 70% des Endoxans im Urin ausgeschieden.(17) Eine spezifische Affinität des Endoxans zu Tumorgewebe konnte bei Mensch und Tier nachgewiesen werden, d.h. der Tumor nimmt mehr Endoxan auf als die übrigen Gewebe.(36)

Die Wirkungsweise des Endoxans beruht auf einer Hemmung der de novo Synthese der DNS,wobei folgende Mechanismen diskutiert werden :

1) Direkte Wirkung auf die DNS
   a) Alkylierung der Pyrimidinbasen oder der Phosphorsäure und sogenanntes "cross linking"(26;40)
   b) Bruch einer Polynucleotidkette nach Alkylierung.(33)

2) Indirekte Wirkung auf die DNS
   a) Hemmung der für die DNS Biosynthese erforderlichen Enzyme.(26;38)
   b) Hemmung der DPN Synthese (9)

Vinblastinsulfat (Velbe)

Vinblastinsulfat, in Deutschland unter dem Handelsnamen Velbe bekannt, ist ein Alkaloid aus Vinca rosea Linn. Dieses Zytostatikum hat sich besonders bei der Behandlung der Lymphogranulomatose bewährt.(19;23;25;41;44)
Die zytostatische Wirksamkeit des Alkaloids ist morphologisch ähnlich der Wirkung des Colchicins durch Blockierung der Zellmitose im Stadium der früheren Metaphase charakterisiert, obgleich klinische und experimentelle Unterschiede deutlich sind. Qualitativ zeigen die blockierten Mitosen polyzentrische und konzentrische Schrumpfformen,sowie Aberrations-,Zerstreuungs- und Degenerationsformen .(20)
Die Nebenwirkungen sind bei den therapeutisch angewandten Dosen gering. Die sich nach einigen Tagen entwickelnde Leukopenie ist schnell reversibel.(19;44) Die Behandlung erfolgt als Stoßtherapie in Dosen von etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht. Als Kriterium für die Gabe eines weiteren Stosses gilt der Wiederanstieg der Leukozyten über 2500.
Die besten therapeutischen Dosen sind die,welche eine geringe Leukopenie verursachen,ohne das Knochenmark stärker zu schädigen.(44) Eine Kreuzresistenz mit Röntgenbestrahlung und alkylierenden Zytostatika wurde nicht festgestellt.(23)
Für die Wirkungsweise werden folgende Mechanismen diskutiert:

1) Eine Behinderung der Synthese der löslichen RNS. Die ribosomale RNS wird nicht beeinträchtigt.Die DNS Synthese wird nur bei sehr hohen Velbegaben gestört.(5;33)
2) Eine Störung des Zellstoffwechsels, besonders des Pasteureffektes.
   a) Behinderung der anaeroben Glykolyse (22)
   b) Eine Stimulierung des aeroben Zuckerabbaues, vielleicht bedingt durch eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung.Möglicherweise kann dadurch die Zelle nicht die Energie für eine regelrechte Mitose aufbringen,(22;34)
3) Eine Verminderung der Purin-Biosynthese.(16)

Besprechung des Untersuchungsmaterials :

Es wurden Blutausstriche von insgesamt elf Patienten untersucht. Davon waren : 7 mit Endoxan(Cyclophosphamid) behandelt und 4 mit Velbe (Vinblastinsulfat).

Mindestens einen Tage vor der Behandlung und soweit möglich täglich während der Behandlung wurde morgens von jedem Patienten in nüchternem Zustand 1,6 ml Venenblut abgenommen und dieses entsprechend dem Mischungsverhältnis bei der Blutkörperchensenkung mit 0,4 ml Na-citrat versetzt. Diesem Citratblut wurde sofort nach der Entnahme aus der Vene 0,4 ml einer 0,5% wässrigen Toluidinblaulösung zugegeben, das Blut-Farbstoffgemisch für eine Stunde im Wasserbad bei 25 Grad belassen und dann in üblicher Weise Objektivträgerausstriche dieses überlebend gefärbten Blutes angefertigt. Die Ausstriche wurden im Polarisationsmikroskop betrachtet. Als Objektiv diente eine Oelimmersion Fl Oel 95/133(Leitz). Die Lichtquelle war eine 6 V Lampe, um dadurch trotz gekreuzter Polarisationsfilter ein ausreichend erleuchtetes Gesichtsfeld zu haben.(29)
Von jedem Ausstrich wurden 200 Polymorphkernige Granulozyten unter gekreuzten Polars auf den Grad ihrer Doppelbrechung hin untersucht. Die früher angegebene Einteilung der Doppelbrechung(29) wurde etwas variiert, sodaß folgendes Auszählschema entstand :

" fein" : Kaum sichtbare,staubfeine,doppelbrechende Strukturen.

" mittel": Gut sichtbare doppelbrechende Strukturen in Größe der neutrophilen Granula.

" grob"1-3:Große doppelbrechende Strukturen, die durch ein schwarzes Polarisationskreuz auf weissem Grund ausgezeichnet sind, und solche Strukturen,die zwar keine deutlich ausgebildeten Polarisationskreuze haben, jedoch dieselbe Größe und Helligkeit wie diese aufweisen.

" grob>3 " : Mehr als drei der unter grob 1-3 beschriebenen Strukturen.

" verklumpt": Größere als die unter grob beschriebenen Strukturen, die wie mehrere zusammengebackene, ineinandergeschobene Polarisationskreuze aussehen. Sie haben denselben Aufbau wie die groben Strukturen, sind jedoch nicht rund, sondern bizarr geformt.

Um den Verlauf der Doppelbrechungsstärke graphisch darstellen zu können, wurde ein Doppelbrechungsindex eingeführt, der die mittlere Doppelbrechung aller ausgezählten Zellen eines Blutausstriches anzeigt.(37)
Dabei erhielten die Zellen mit dem Doppelbrechungsgrad

fein	: den Wert	1
mittel	: " "	2
grob 1-3	: " "	3
grob>3	: " "	4
verklumpt	: " "	4

Die Summe aller dieser Werte wurde durch die Anzahl der berücksichtigten Zellen dividiert. Man erhält so einen dimensionslosen Wert>1, mit welchem ohne Schwierigkeiten der Verlauf der durchschnittlichen Doppelbrechung während der gesamten Behandlung anhand der täglichen Blutausstriche graphisch dargestellt werden konnte.

Grundsätzlich ähnlich ist die Methode, die bei den in Vitro-Versuchen angewandt wurde. Als Testsubstanzen wurden : Endoxan, Velbe,KCN,Hydro-Cortison,Butazolidin hinzugegeben.

a) Endoxan: Es stand das Blut von zwei gesunden Versuchspersonen zur Verfügung. Von jeder wurden 3 x 1,6 ml Venenblut in getrennten Spritzen entnommen. In jeder Spritze befanden sich 0,4 ml Na-Citrat in welchem bei der :

1. Spritze 3 mg Endoxan gelöst war
2. Spritze 30 mg Endoxan gelöst war
3. Spritze nichts gelöst war, sie diente als Kontrollwert

Das Blut wurde dann wie üblich mit 0,4 ml Toluidinblau inkubiert, jedoch abweichend von der oben angegebenen Methode nach 15,30,60,90 Minuten Objektträgerausstriche angefertigt, diese nach dem oben angegebenen Schema ausgezählt und der Grad der Doppelbrechung graphisch dargestellt.

Ähnliche Inkubations-Versuche mit Endoxan lagen schon vor. Dort wurde Heparinblut benutzt und die Blutausstriche, die nach verschieden langer Inkubationszeit angefertigt worden waren, nach P a p p e n h e i m gefärbt. Es stellten sich dann bei den neutrophilen Granulozyten toxische Granulationen und pyknotische Kernformen dar, deren Entstehung auf das Endoxan zurückgeführt werden konnte.(37)

b) Velbe : Es stand das Blut von zwei gesunden Versuchspersonen zur Verfügung. Von jeder wurden 2 mal 1,6 ml Blut in getrennten Spritzen entnommen. In den 0,4 ml Citrat war bei der :

1. Spritze 0,1 mg Velbe gelöst
2. Spritze war nichts gelöst,sie diente als Kontrollwert

c) KCN : Es stand das Blut von zwei gesunden Versuchspersonen zur Verfügung. Von jeder wurden 3 mal 1,6 ml Blut in getrennten Spritzen entnommen. Den 0,4 ml Na-Citrat war bei der :

1. Spritze 0,1 ml KCN (0,1%) zugesetzt
2. Spritze 0,5 ml KCN (0,1%) zugesetzt
3. Spritze war nichts zugesetzt, sie diente als Kontrollwert.

Bei b) und c) wurde das Blut ebenfalls mit 0,4 ml Toluidinblau

inkubiert, nach 15,30,60,90 Minuten Objektträgerausstriche angefertigt, diese nach dem oben angegebenen Schema ausgezählt und das Verhalten der Doppelbrechung graphisch dargestellt.

d) Hydrocortison : Es stand das Blut von zwei gesunden Versuchspersonen zur Verfügung. Von jeder wurde 9 mal 1,6 ml Blut entnommen. Den 0,4 ml Na-Citrat in der Spritze war bei der :

1. Spritze	1 mg Hydrocortison in 0,2 ml 50% Alkohol zugesetzt
2. Spritze	als Kontrollwert nur 0,2 ml 50% Alkohol zugesetzt
3. Spritze	0,5 mg Hydrocortison in 0,1 ml 50% Alkohol zugesetzt
4. Spritze	als Kontrollwert nur 0,1 ml 50% Alkohol zugesetzt
5. Spritze	0,25 mg Hydrocortison in 0,05 ml 50% Alkohol gelöst zugesetzt
6. Spritze	als Kontrollwert nur 0,05 ml 50% Alkohol zugesetzt
7. Spritze	0,125 mg Hydrocortison in 0,025 ml 50% Alkohol gelöst zugesetzt
8. Spritze	als Kontrollwert nur 0,025 ml 50% Alkohol zugesetzt
9. Spritze	wurde nichts zugesetzt

Das Blut wurde dann mit 0,4 ml Toluidinblau inkubiert, nach 30,60,90,120, Minuten Objektträgerausstriche angefertigt, und diese nach dem oben angegebenen Schema ausgezählt.

e) Tuschespeicherung : Es stand das Blut von zwei gesunden Versuchspersonen zur Verfügung. Von der 1.Versuchsperson wurden etwa 2 ml von der 2. etwa 4 ml Blut entnommen. Das Blut wurde ungerinnbar gemacht,indem es in einem Erlenmeyerkolben mit Glas-

kugeln zusammen solange geschüttelt wurden, bis das Fibrin ausfiel.(31)

Von der 1. Versuchsperson wurden 1,6 ml Blut zusammen mit 2 Tropfen Tusche in einem Spitzgläschen im Wasserbad bei 25 Grad inkubiert.

Von der 2. Versuchsperson wurden 2 mal 1,6 ml Blut in 2 Spitzgläschen im selben Wasserbad inkubiert,wobei einem der Gläschen vorher noch 0,3 ml 0,1% KCN zugegeben wurde.

Nach 20 Minuten wurde allen Gläschen 0,4 ml Toluidinblau zugegeben, nach 45,60,90,120 Minuten Objektträgerausstriche angefertigt und an 200 neutrophilen Granulozyten der Grad der Doppelbrechung und der Grad der Tuschespeicherung zu gleicher Zeit bestimmt. Der Grad der Doppelbrechung wurde nach dem oben angegebenen Schema festgelegt. Der Grad der Tuschespeicherung wurde folgendermaßen bestimmt :

" nicht" :	Keine Tuschespeicherung sichtbar	erhielt den Wert 1
" mittel":	Tuschespeicherung in Größe neutrophiler Granula sichtbar	erhielt den Wert 2
" grob" :	Tuschespeicherung in Größe der doppelbrechenden Strukturen,die ein Polarisationskreuz ergeben	erhielt den Wert 3
"verklumpt":	Tuschespeicherung in Größe der mit "verklumpt" bezeichneten doppelbrechenden Strukturen	erhielt den Wert 4

Die durchschnittliche Tuschespeicherung aller ausgezählten Zellen eines Ausstriches wurde wie bei der durchschnittlichen Doppelbrechung errechnet und graphisch in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Kritik an der Methode

Schon früher wurde auf die mangelnden objektiven Kriterien für eine genaue Abgrenzung des Doppelbrechungsgrades " fein" einerseits und " mittel" andererseits hingewiesen.(39) Eine Unterscheidung ist hier nur auf Grund der unterschiedlichen Größe der doppelbrechenden Strukturen möglich. Unter der Zytostatikabehandlung wurde nun auch die Definition " grob" problematisch, da unter der Behandlung, die besonders bei akuten Entzündungen sehr deutlich ausgebildeten Polarisationskreuze ihre Regelmäßigkeit verloren; zum Teil verschwanden sie sogar ganz. Für die während der Behandlung, vor allem mit Velbe, zunehmenden großen, unregelmässigen doppelbrechenden Strukturen, die z.T. wie mehrere ineinandergeschobene Polarisationskreuze aussehen, wurde der Begriff "verklumpt" eingeführt. Aber bei den Strukturen, die zwischen " mittel" und "grob" liegen, also größer als die neutrophilen Granula sind, jedoch kein Polarisationskreuz haben, oder nur einen Balken desselben erkennen lassen, mußte allein nach der Größe entschieden werden. War das Gebilde so groß wie die ein Polarisationskreuz tragenden doppelbrechenden Strukturen, so wurde es zu grob gezählt; war es kleiner,zu mittel. Dadurch sind methodische Fehlermöglichkeiten gegeben. Besonders wenn mehrere Untersucher den gleichen Fall bearbeiten, kann es im Ergebnis zu großen Differenzen kommen. In der Hand eines Untersuchers ist die Methode jedoch brauchbar, da mit einiger Übung auch die Beurteilung der Größe sehr gut gelingt. Um auch die eigene Fehlerbreite so klein wie möglich zu halten, wurden die Präparate, welche in der Zeit zwischen zwei Zytostatikagaben angefertigt wurden, an einem Tag durchgezählt. Bei erneuter Zählung nach einigen Tagen wurde jeweils das letzte Präparat der vorausgegangenen Serie nochmals nachgeprüft, und damit die eigene Zählmethode geeicht.

Eine Nachprüfung alter Ergebnisse nach mehr als zwei Monaten ist nicht möglich, da die Präparate im Laufe der Zeit an Doppelbrechung verlieren. Nach etwa einem halben Jahr ist

zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern kaum noch ein Aufleuchten sichtbar.

C Ergebnisse bei den 11 mit Zytostatika behandelten Patienten

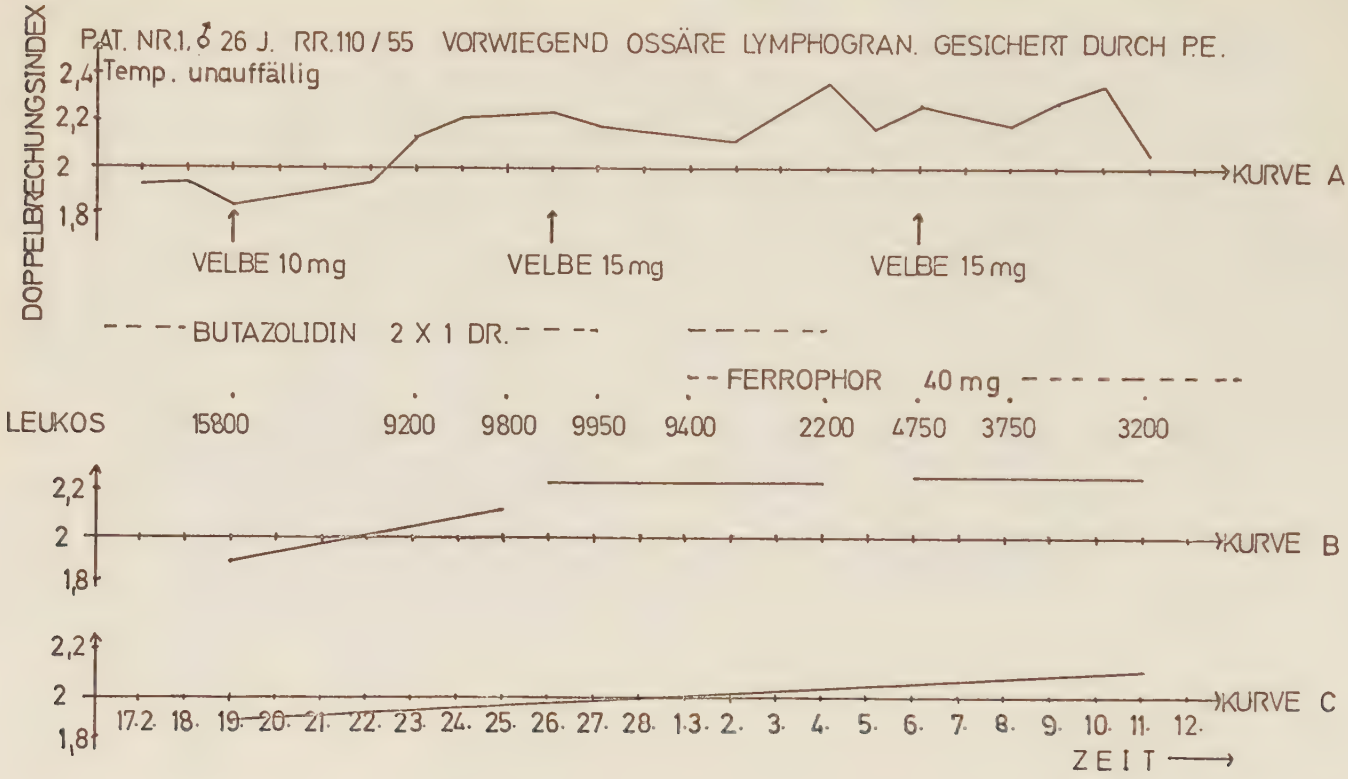
Die Auszählergebnisse von jedem der 11 Patienten wurden in drei Kurven dargestellt.

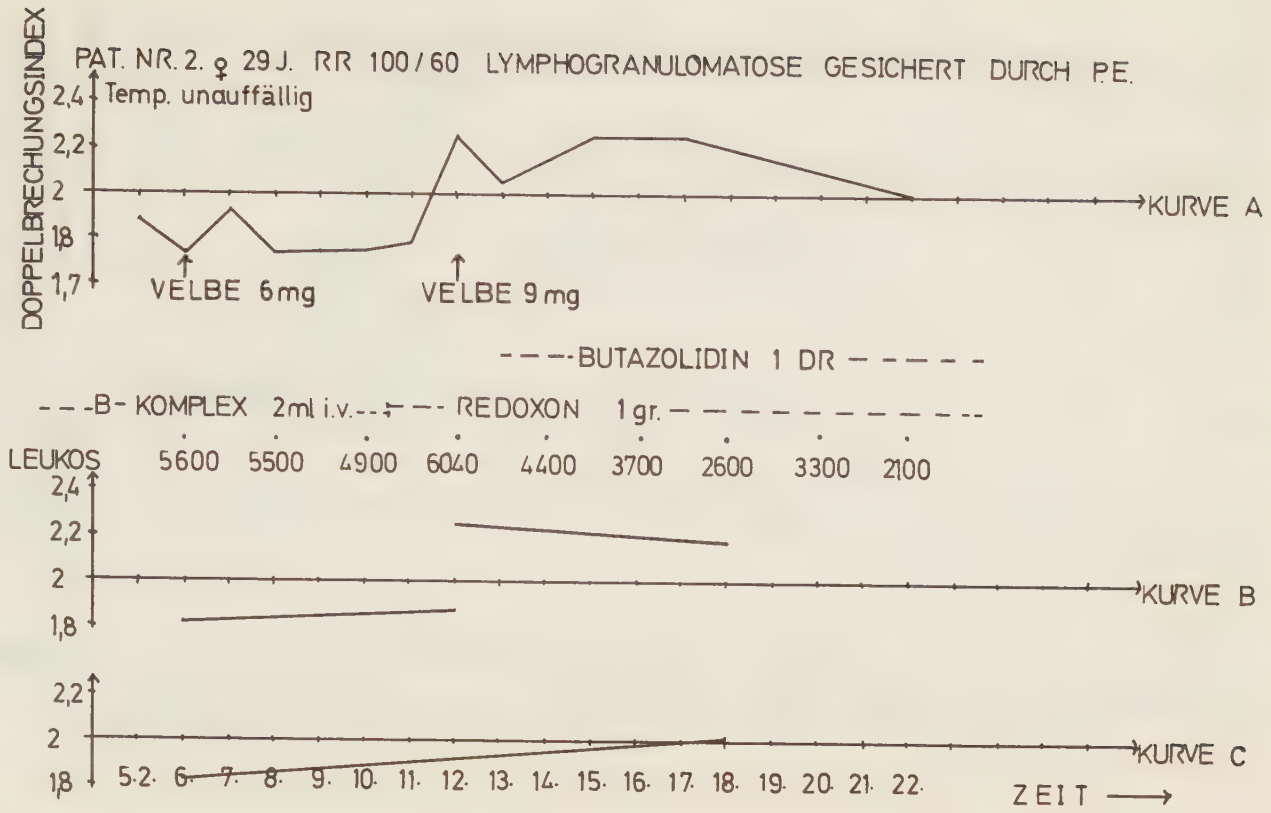
Kurve A : Von jedem der täglichen Ausstriche wurde der Doppelbrechungsindex bestimmt und dieser graphisch aufgetragen.

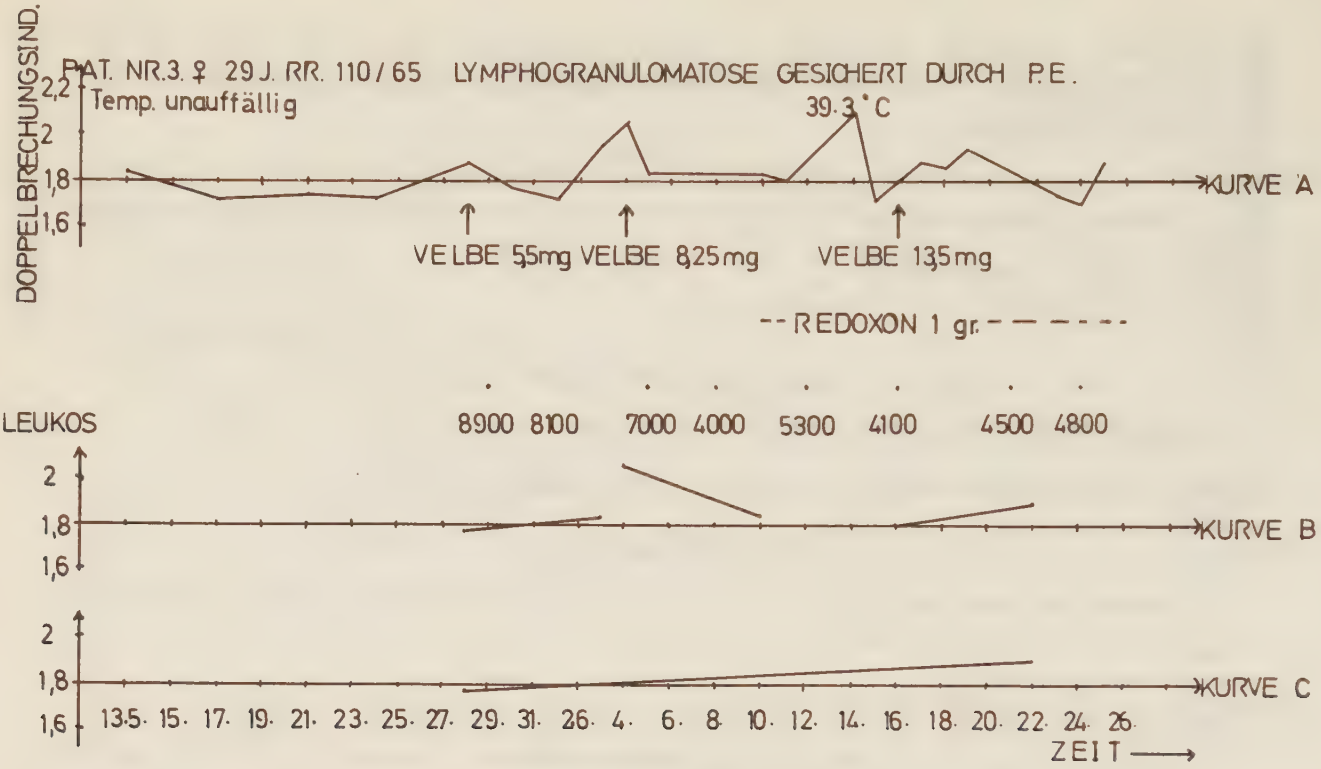
Kurve B : Der Mittelwert, errechnet aus den Doppelbrechungsindices vor der Behandlung,und der Mittelwert, errechnet aus dem Doppelbrechungsindices der sechs auf die Cytostaticagabe folgenden Tage, wurden graphisch aufgetragen und verglichen,um sehen zu können, ob sich die Gesamtdoppelbrechung in dieser Zeit ändert. Bei den 2. und weiteren Cytostatikagaben wurde der letzte Wert vor erneuter Behandlung aufgetragen und damit wieder der Mittelwert aus den Doppelbrechungsindices der sechs folgenden Tage verglichen.

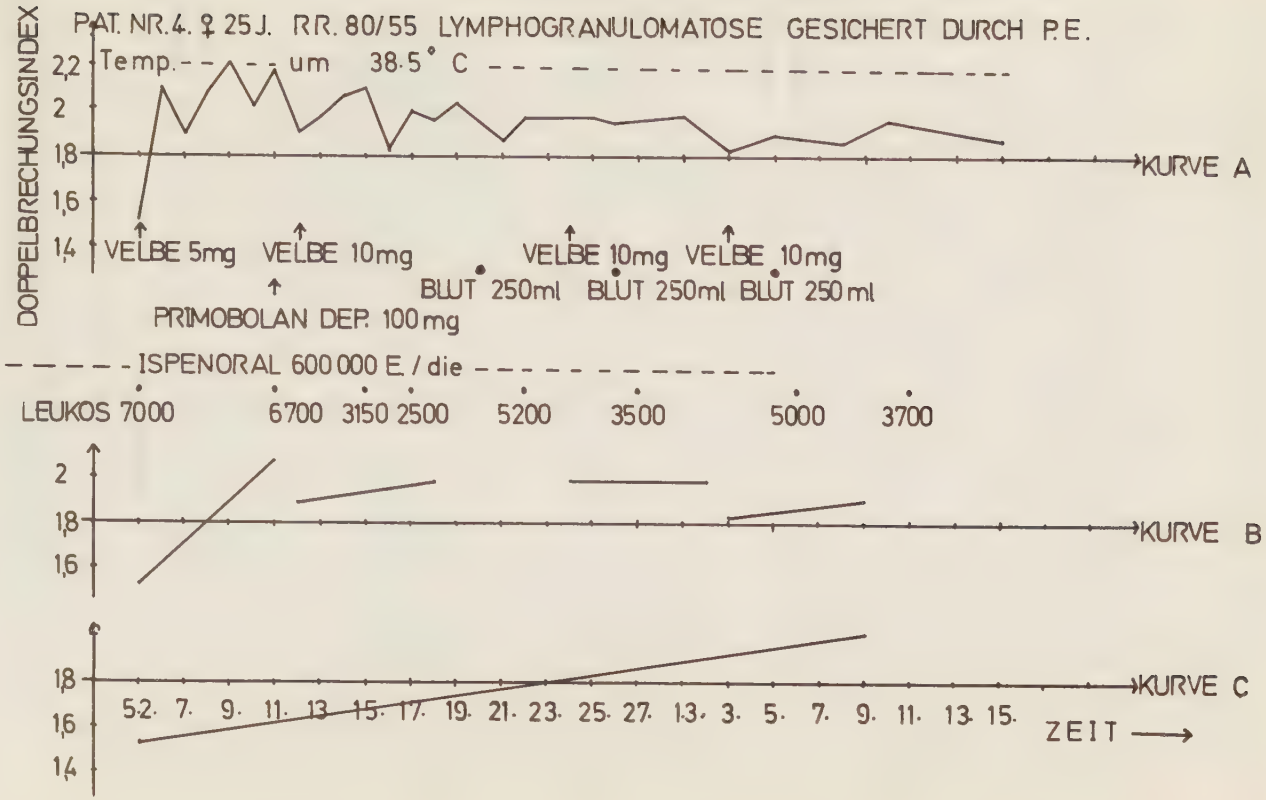
Kurve C : Der Mittelwert aus allen Doppelbrechungsindices eines Patienten vor der Behandlung und der Mittelwert aus allen Doppelbrechungsindices während der Behandlung wurden graphisch aufgetragen und miteinander verglichen, um zu sehen, ob sich die Gesamtdoppelbrechung vor der Behandlung von jener während der Behandlung unterscheidet.

a) Die Kurven der 4 mit Velbe behandelten Patienten


PAT. NR.1. ♂ 26 J. RR.110/55 VORWIEGEND OSSÄRE LYMPHOGRAN. GESICHERT DURCH P.E.
DOPPELBRECHUNGSINDEX
2,4
2,2
2
1,8
Temp. unauffällig
KURVE A
VELBE 10 mg
VELBE 15 mg
VELBE 15 mg
BUTAZOLIDIN 2 X 1 DR.
FERROPHOR 40 mg
LEUKOS
15800
9200
9800
9950
9400
2200
4750
3750
3200
KURVE B
KURVE C
17.2. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 1.3. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.
ZEIT


PAT. NR. 2. ♀ 29 J. RR 100/60 LYMPHOGRANULOMATOSE GESICHERT DURCH P.E.
DOPPELBRECHUNGSINDEX
2,4
2,2
2
1,8
1,7
Temp. unauffällig
KURVE A
VELBE 6mg
VELBE 9mg
BUTAZOLIDIN 1 DR
B-KOMPLEX 2ml i.v.
REDOXON 1 gr.
LEUKOS
5600 5500 4900 6040 4400 3700 2600 3300 2100
KURVE B
KURVE C
5.2. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22.
ZEIT


DOPPELBRECHUNGSIND.
PAT. NR.3. ♀ 29 J. RR. 110/65 LYMPHOGRANULOMATOSE GESICHERT DURCH P.E.
Temp. unauffällig
39.3 °C
2,2
2
1,8
1,6
KURVE A
VELBE 5,5mg
VELBE 8,25mg
VELBE 13,5mg
-- REDOXON 1 gr. - — - - -
LEUKOS
8900 8100 7000 4000 5300 4100 4500 4800
2
1,8
1,6
KURVE B
2
1,8
1,6
KURVE C
13.5. 15. 17. 19. 21. 23. 25. 27. 29. 31. 26. 4. 6. 8. 10. 12. 14. 16. 18. 20. 22. 24. 26.
ZEIT ⟶


PAT. NR. 4. ♀ 25 J. RR. 80/55 LYMPHOGRANULOMATOSE GESICHERT DURCH P.E.
DOPPELBRECHUNGSINDEX
Temp. - - - - um 38.5° C
2,2
2
1,8
1,6
1,4
KURVE A
VELBE 5mg
VELBE 10mg
VELBE 10mg
VELBE 10mg
PRIMOBOLAN DEP. 100mg
BLUT 250ml
BLUT 250ml
BLUT 250ml
ISPENORAL 600 000 E. / die
LEUKOS 7000
6700
3150
2500
5200
3500
5000
3700
2
1,8
1,6
KURVE B
1,8
1,6
1,4
KURVE C
5.2. 7. 9. 11. 13. 15. 17. 19. 21. 23. 25. 27. 13. 3. 5. 7. 9. 11. 13. 15.
ZEIT

b) Besprechung der Ergebnisse der mit Velbe behandelten Patienten :

Zu den Kurven A : Von den 4 mit Velbe behandelten Patienten erhielten 3 vor und während dieser Therapie Butazolidin, Vitaminpräparate und Eisenpräparate. Veränderungen der doppelbrechenden Strukturen in den polymorphkernigen Leukozyten wurden hierunter nicht bemerkt. Die während der Behandlung 4-5 Tage nach einem Velbestoß auftretenden Leukopenien waren mild, die Leukozyten sanken nie unter 2000. Soweit Werte vor der Behandlung vorhanden waren, fiel auf, daß diese relativ geringgradig um einen Normwert, der für jeden Patienten verschieden war, schwankten. Die Einteilung in die einzelnen Doppelbrechungsgrade gelang ohne Mühe. Die mit " verklumpt" bezeichneten Strukturen kamen beinahe nie vor.

Nach dem ersten Velbestoß wurde das Bild unruhiger. Die Doppelbrechungsindices schwankten von Tag zu Tag beträchtlich. Insgesamt konnte eine Zunahme der Doppelbrechung beobachtet werden. Das Maximum der Doppelbrechung wurde nach etwa 4-7 Tagen erreicht.
Über den Zeitpunkt, wann die Doppelbrechung endgültig wieder zum Ausgangswert zurückkehrt, kann keine Aussage gemacht werden, da 6-10 Tage nach dem 1. Velbestoß schon der 2. folgte. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nie ein endgültiges Zurücksinken der Doppelbrechung zum Ausgangswert beobachtet werden. Bei den 2. und weiteren Velbestößen stieg die Doppelbrechung, oft nach anfänglicher Abnahme, nach etwa 4-6 Tagen wieder auf ein Maximum an, das etwa jenem nach dem 1.Stoß entsprach.
Mit Beginn der Behandlung änderte sich der Charakter der Doppelbrechung. Die Einteilung in die verschiedenen Doppelbrechungsgrade wurde schwieriger :

Die feinen Strukturen nahmen sehr stark ab.

Die mittleren Strukturen nahmen zu. Sie begannen in ihrer Größenordnung beträchtlich zu schwanken.

Die groben Strukturen nahmen zu, sie waren z.T. schwierig zu beurteilen, da sie ihre Polarisationskreuze häufig verloren. Meist konnten sie nur noch durch ihre Größe eingeordnet werden.

Die mit verklumpt bezeichneten Strukturen nahmen deutlich zu (bis zu 10%). Sie können sehr groß werden und bis zu einem Drittel des Protoplasmas ausmachen.

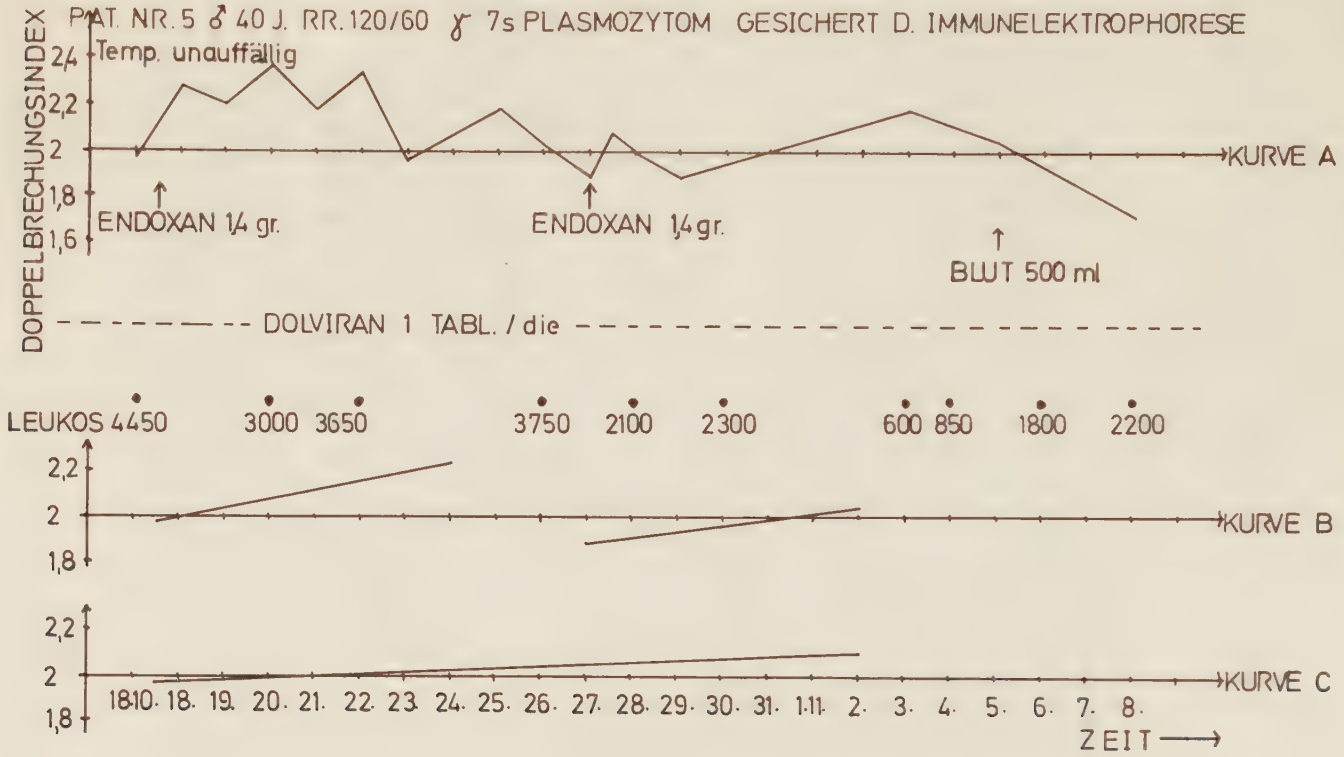
Zu den Kurven B : Sie zeigen bei allen 4 Patienten, daß nach dem 1. Velbestoß die mittlere Doppelbrechung an den 6 auf den Stoß folgenden Tagen immer höher liegt, als der Ausgangswert. Bei den weiteren Stössen konnte folgendes festgestellt werden :
Lag der Ausgangswert nahe dem Maximalwert, so trat ein weiterer Anstieg der Doppelbrechung nicht auf,war aber der Wert deutlich unter dem Maximalwert, so lag die mittlere Doppelbrechung der 6 auf den weiteren Stoß folgenden Tage wieder höher, oder mindestens gleich hoch, wie der Bezugswert. In keinem Falle lag die mittlere Doppelbrechung von 6 auf einen beliebigen Stoß folgenden Tagen niedriger als der Wert vor der Behandlung.

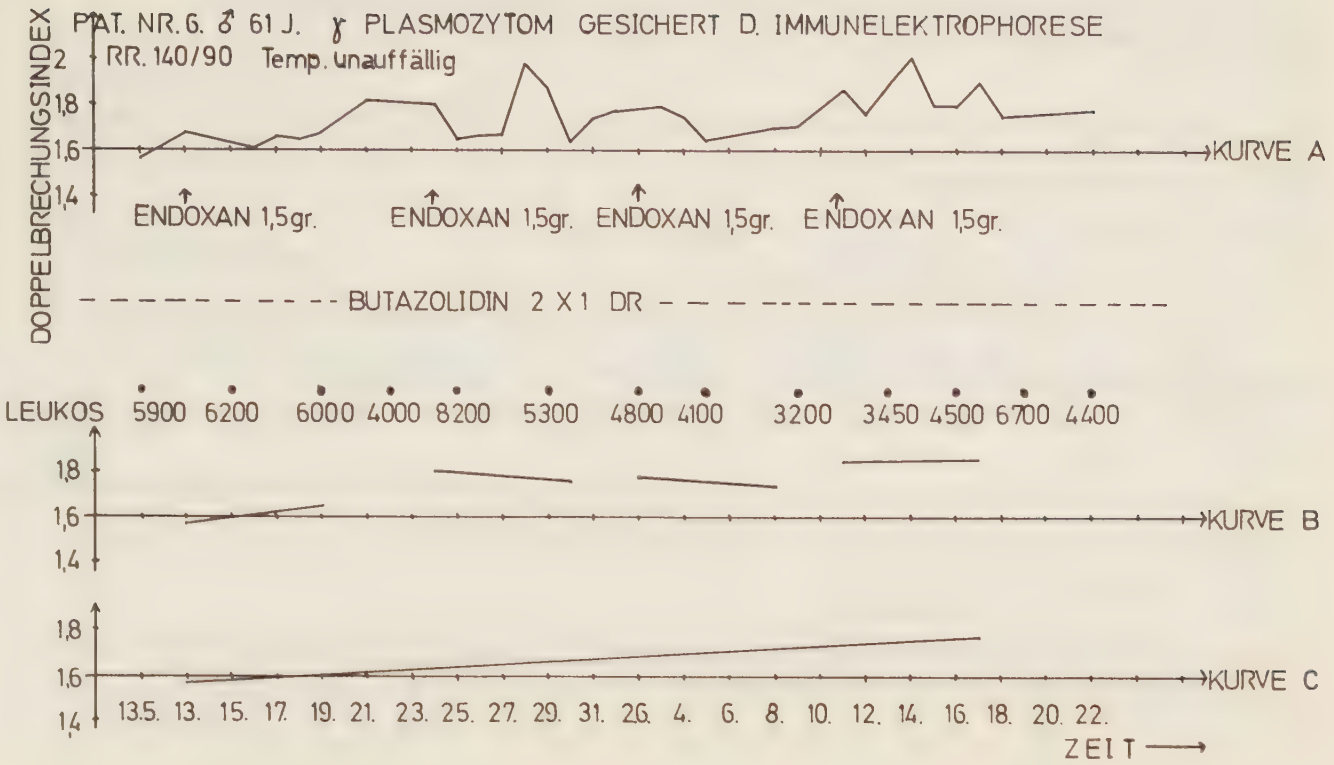
Zu den Kurven C : Sie zeigen, daß bei allen 4 Patienten die Mittelwerte,errechnet aus allen Doppelbrechungsindices eines Patienten, während der Behandlung höher liegen als jene vor der Behandlung.

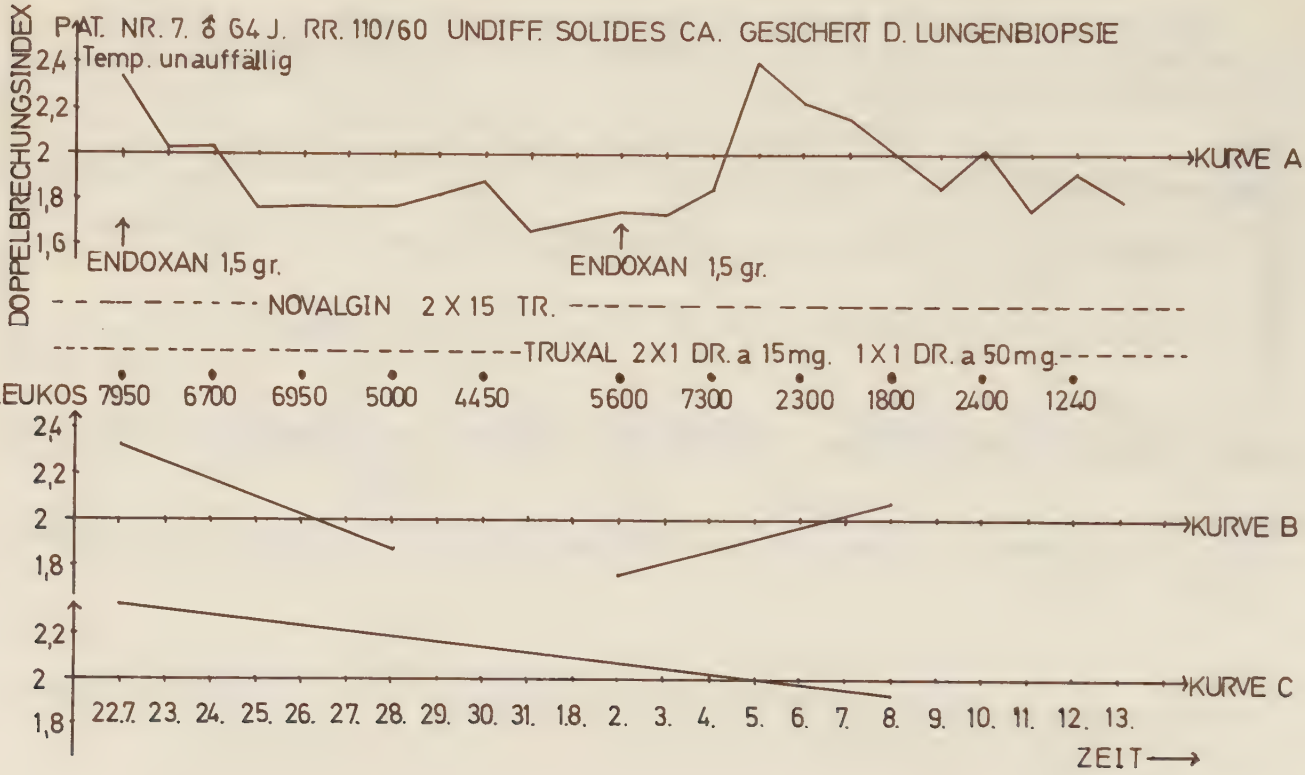
C) Kritik an den Ergebnissen der mit Velbe behandelten Patienten

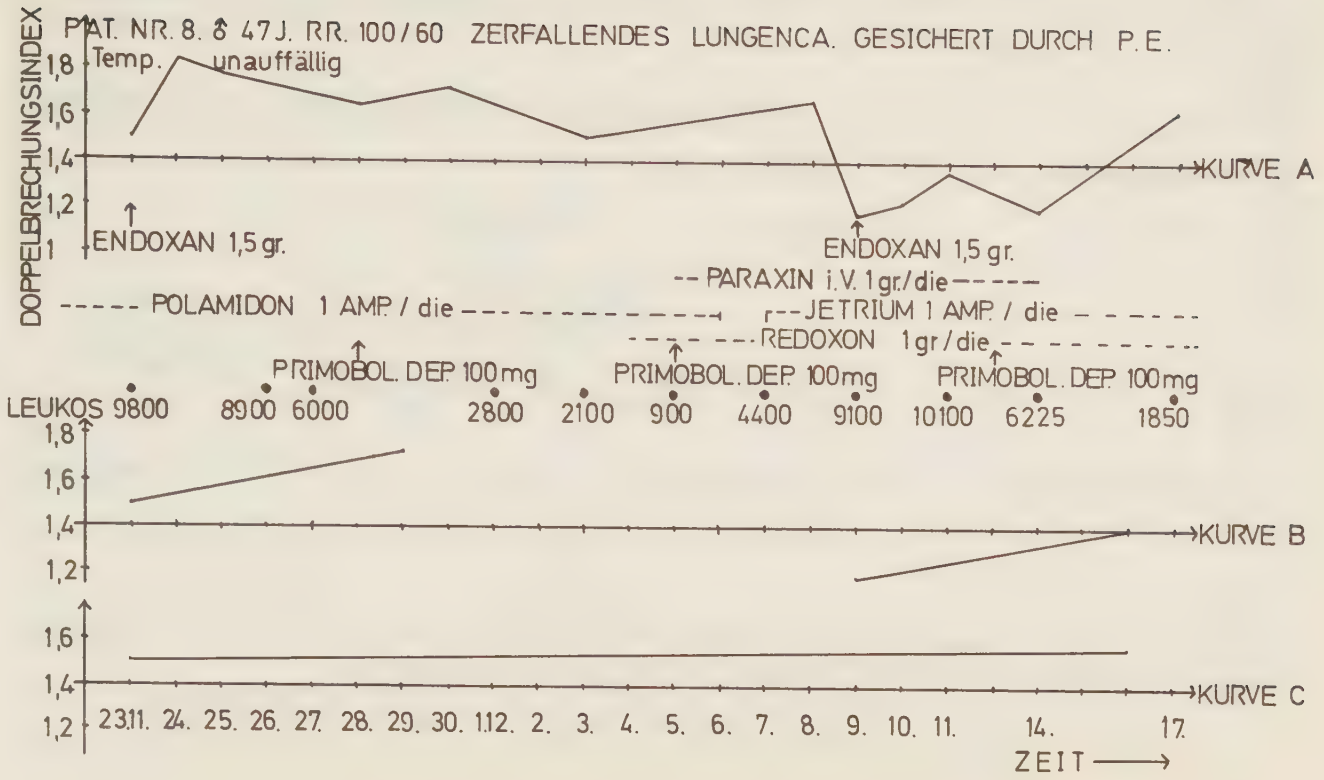
Ob die Vermehrung der Doppelbrechung allein auf das Cytostatikum zurückzuführen ist, kann hier nicht endgültig entschieden werden. Jedoch können die übrigen Medikamente weitgehend ausgeschlossen werden, da diese meist schon vor der Zytostatikabehandlung und ehe die oben beschriebenen Veränderungen auftraten, gegeben wurden.
Schwieriger war es, wenn ein Patient Fieber oder eine akute Entzündung hatte. Bekanntlich steigt auch dadurch die Doppelbrechung an.(18;39)
Bei Patient Nr.1 und 2 ist die Frage gegenstandslos, da sie während der ganzen Behandlung keine Temperatur aufwiesen.
Bei Patient Nr.3 wurde lediglich am 11. und 12.6. Temperatur um 39° C festgestellt; diese sank jedoch dann wieder zum Normalwert ab. Vielleicht ist jedoch damit die maximale Zunahme der Doppelbrechung am 14.6. zu erklären. Sie kann mit der letzten Zytostatikagabe, die schon 10 Tage zurücklag, nicht mehr in Zusammenhang gebracht werden. Da von diesen Tagen einige Blutausstriche fehlen, waren genauere Beobachtungen nicht möglich.
Bei Patient Nr.4 waren während der ganzen Therapie hohe Temperaturen vorhanden, sodaß die hier besonders starken Schwankungen der Doppelbrechung sicher nicht allein auf das Zytostatikum zurückzuführen sind.Eine Einwirkung des Zytostatikums auf die Doppelbrechung kann jedoch sicher angenommen werden, da nicht die bei einer Entzündung typischen Strukturen mit gut ausgebildeten Polarisationskreuzen vermehrt waren, sondern im Laufe der Behandlung die oben auf das Zytostatikum zurückgeführten groben, unregelmässigen Strukturen auftraten.

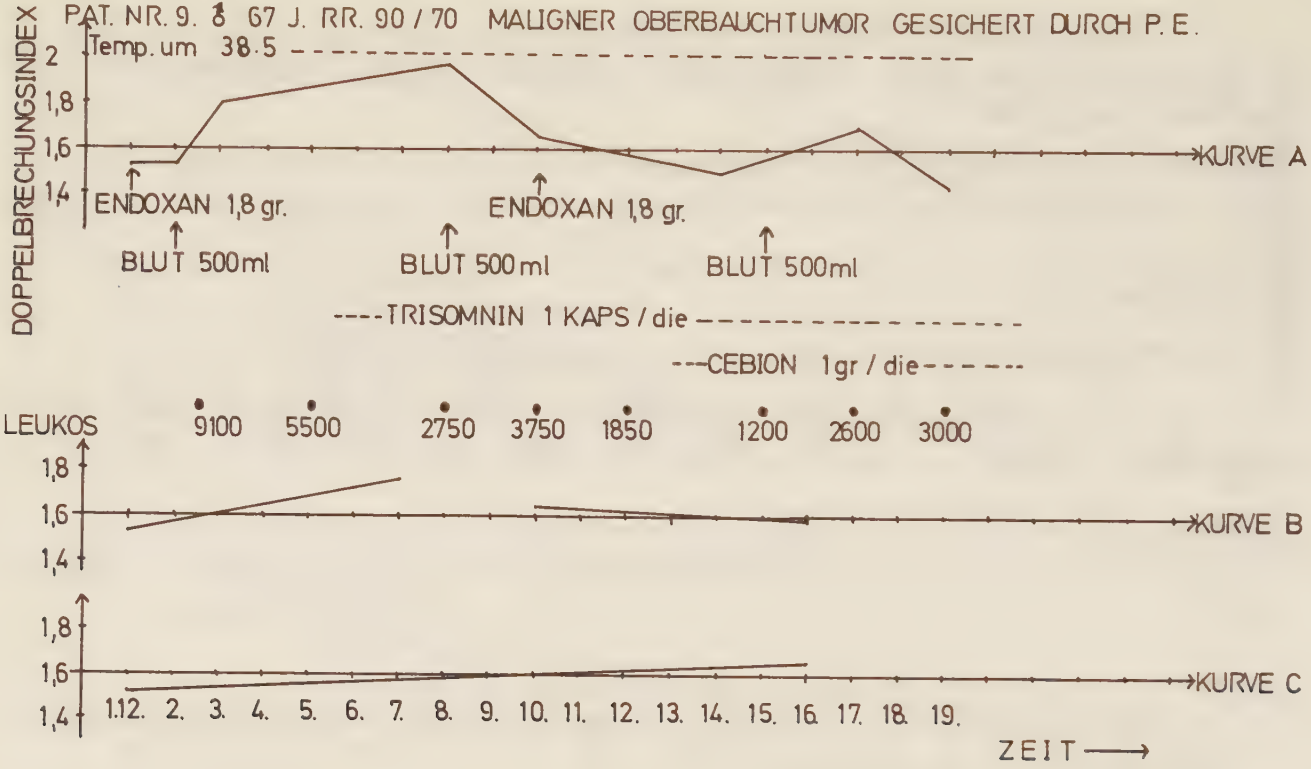
d) Die Kurven der 7 mit Endoxan behandelten Patienten

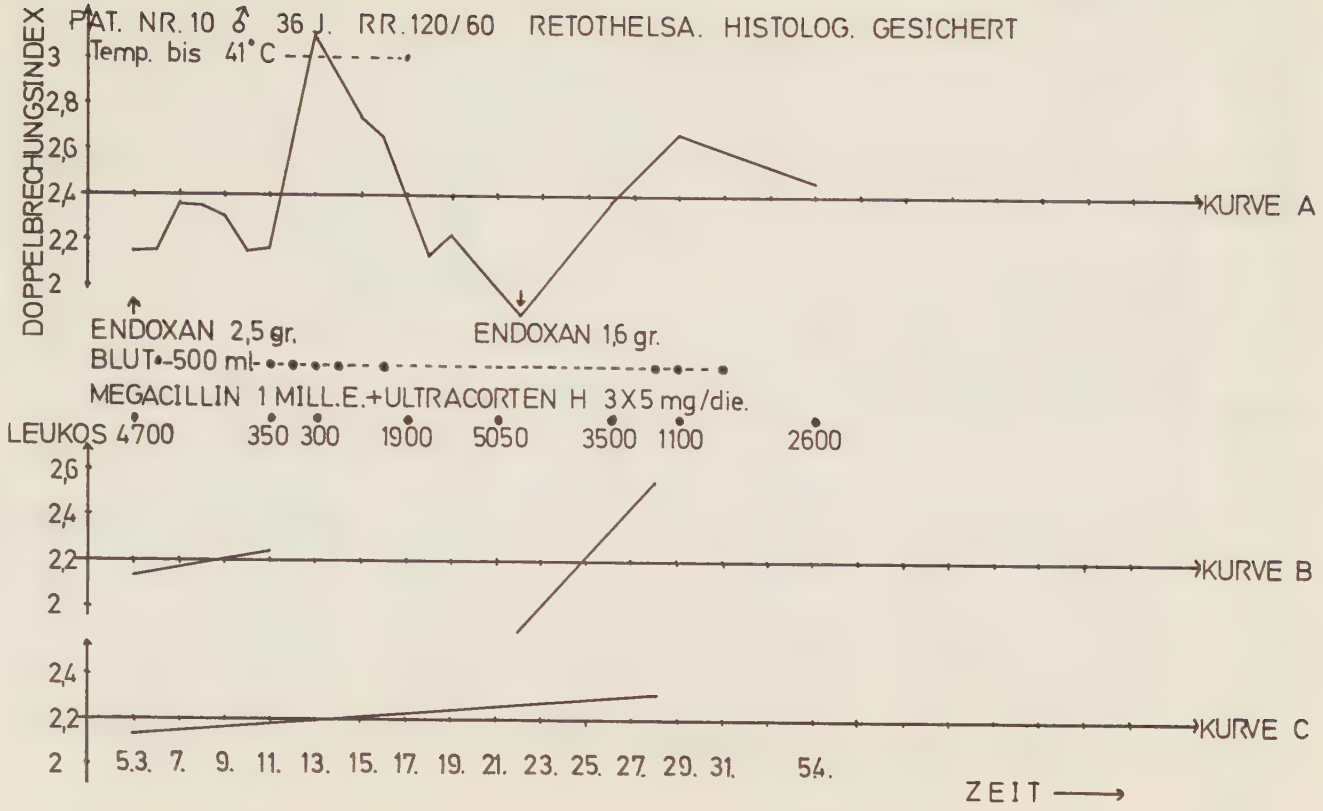

PAT. NR. 5 ♂ 40 J. RR. 120/60 ♂ 7s PLASMOZYTOM GESICHERT D. IMMUNELEKTROPHORESE
DOPPELBRECHUNGSINDEX
Temp. unauffällig
2,4
2,2
2
1,8
1,6
ENDOXAN 1,4 gr.
ENDOXAN 1,4 gr.
BLUT 500 ml
KURVE A
DOLVIRAN 1 TABL. / die
LEUKOS 4450 3000 3650 3750 2100 2300 600 850 1800 2200
2,2
2
1,8
KURVE B
2,2
2
1,8
KURVE C
18.10. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 1.11. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.
ZEIT

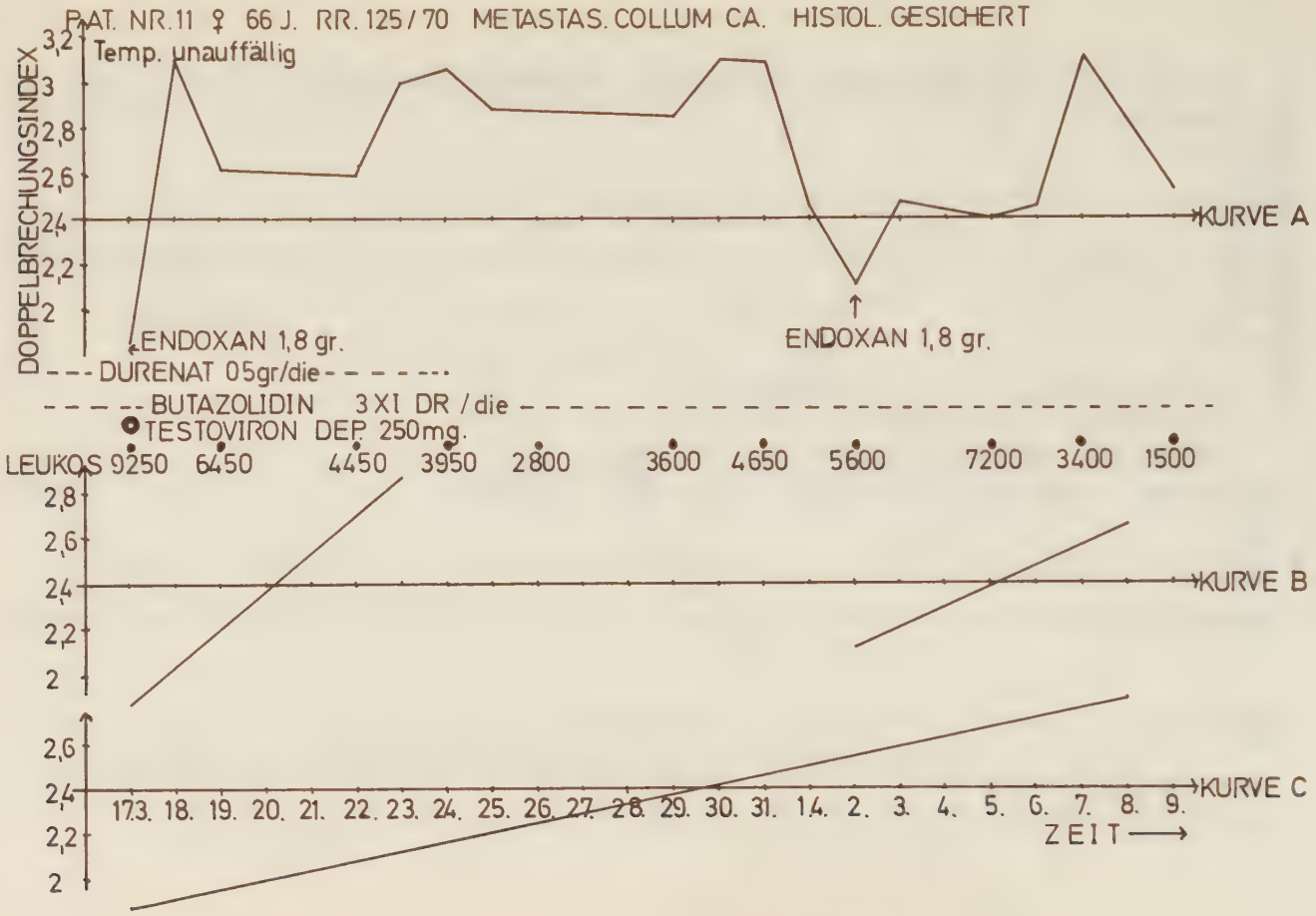

PAT. NR. 6. ♂ 61 J. ♂ PLASMOZYTOM GESICHERT D. IMMUNELEKTROPHORESE
RR. 140/90 Temp. unauffällig
DOPPELBRECHUNGSINDEX
2
1,8
1,6
1,4
KURVE A
ENDOXAN 1,5gr.
ENDOXAN 1,5gr.
ENDOXAN 1,5gr.
ENDOXAN 1,5gr.
BUTAZOLIDIN 2 X 1 DR
LEUKOS 5900 6200 6000 4000 8200 5300 4800 4100 3200 3450 4500 6700 4400
1,8
1,6
1,4
KURVE B
1,8
1,6
1,4
KURVE C
13.5. 13. 15. 17. 19. 21. 23. 25. 27. 29. 31. 26. 4. 6. 8. 10. 12. 14. 16. 18. 20. 22.
ZEIT


PAT. NR. 7. ♂ 64 J. RR. 110/60 UNDIFF. SOLIDES CA. GESICHERT D. LUNGENBIOPSIE
DOPPELBRECHUNGSINDEX
Temp. unauffällig
2,4
2,2
2
1,8
1,6
KURVE A
ENDOXAN 1,5 gr.
ENDOXAN 1,5 gr.
NOVALGIN 2 X 15 TR.
TRUXAL 2X1 DR. a 15mg. 1X1 DR. a 50mg.
LEUKOS 7950 6700 6950 5000 4450 5600 7300 2300 1800 2400 1240
KURVE B
KURVE C
22.7. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 1.8. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13.
ZEIT


PAT. NR. 8. ♂ 47 J. RR. 100/60 ZERFALLENDES LUNGENCA. GESICHERT DURCH P.E.
DOPPELBRECHUNGSINDEX
Temp. unauffällig
1,8
1,6
1,4
1,2
1
KURVE A
ENDOXAN 1,5 gr.
ENDOXAN 1,5 gr.
-- PARAXIN i.V. 1 gr./die -----
----- POLAMIDON 1 AMP. / die ----------
---JETRIUM 1 AMP. / die ------
---------REDOXON 1 gr / die ----------
PRIMOBOL. DEP. 100 mg
PRIMOBOL. DEP. 100 mg
PRIMOBOL. DEP. 100 mg
LEUKOS 9800 8900 6000 2800 2100 900 4400 9100 10100 6225 1850
1,8
1,6
1,4
1,2
KURVE B
1,6
1,4
1,2
KURVE C
23.11. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 1.12. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 14. 17.
ZEIT ⟶


PAT. NR. 9. ♂ 67 J. RR. 90 / 70 MALIGNER OBERBAUCHTUMOR GESICHERT DURCH P.E.
DOPPELBRECHUNGSINDEX
Temp. um 38·5
2
1,8
1,6
1,4
KURVE A
ENDOXAN 1,8 gr.
BLUT 500ml
ENDOXAN 1,8 gr.
BLUT 500ml
BLUT 500ml
----TRISOMNIN 1 KAPS / die
---CEBION 1gr / die
LEUKOS
9100
5500
2750
3750
1850
1200
2600
3000
KURVE B
KURVE C
1.12. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19.
ZEIT


PAT. NR. 10 ♂ 36 J. RR. 120/60 RETOTHELSA. HISTOLOG. GESICHERT
Temp. bis 41° C
DOPPELBRECHUNGSINDEX
3
2,8
2,6
2,4
2,2
2
KURVE A
ENDOXAN 2,5 gr.
ENDOXAN 1,6 gr.
BLUT-500 ml
MEGACILLIN 1 MILL.E.+ULTRACORTEN H 3X5 mg/die.
LEUKOS 4700 350 300 1900 5050 3500 1100 2600
2,6
2,4
2,2
2
KURVE B
2,4
2,2
2
KURVE C
5.3. 7. 9. 11. 13. 15. 17. 19. 21. 23. 25. 27. 29. 31. 54.
ZEIT


PAT. NR. 11 ♀ 66 J. RR. 125/70 METASTAS. COLLUM CA. HISTOL. GESICHERT
Temp. unauffällig
DOPPELBRECHUNGSINDEX
3,2
3
2,8
2,6
2,4
2,2
2
KURVE A
ENDOXAN 1,8 gr.
ENDOXAN 1,8 gr.
DURENAT 05gr/die
BUTAZOLIDIN 3 X I DR / die
TESTOVIRON DEP. 250mg.
LEUKOS 9250 6450 4450 3950 2800 3600 4650 5600 7200 3400 1500
KURVE B
KURVE C
17.3. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 14. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.
ZEIT

e) Besprechung der Ergebnisse der mit Endoxan behandelten Patienten :

Zu den Kurven A : Grundsätzlich ähnlich wie bei Velbebehandlung sind die Vorgänge bei der Endoxanbehandlung. Die 7 Patienten erhielten schon vor der Behandlung Hormon- und Vitaminpräparate, Sedativa, schmerzlindernde Mittel, 2 erhielten außerdem Blutkonserven, ohne daß bei der Doppelbrechung irgendwelche Besonderheiten auftraten. Die sich einige Tage nach dem Endoxanstoß entwickelnde Leukopenie war hier stärker ausgeprägt und dauerte länger als bei den mit Velbe behandelten Patienten. Es kamen Werte bis zu 300 Leukozyten vor.
Nach dem 1. Endoxanstoß begann auch hier der Doppelbrechungsindex von Tag zu Tag sehr stark zu schwanken. Insgesamt wurde eine Zunahme der Doppelbrechung beobachtet. Bei Patient Nr.7 sank die Doppelbrechung während des 1. Endoxanstosses. Hier war schon der Ausgangswert nahe dem später erreichten Maximalwert. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Bei dem Patienten wurde 3 Tage vor Anfertigung des 1. Blutausstriches eine Sternalpunktion und eine Probeexcision durchgeführt. Für eine Infektion, welche die hohe Doppelbrechung erklärt hätte, konnte jedoch kein Anhalt gefunden werden.
Bei den übrigen Patienten wurde das Maximum der Doppelbrechung nach 3-7 Tagen erreicht; dieselbe Regelmäßigkeit wie im Blut jener Patienten, welche Velbe erhielten, konnte allerdings nicht festgestellt werden.
Ein maximaler Anstieg der Doppelbrechung war auch schon am Tage nach dem 1. Endoxanstoß möglich. Bei den weiteren Endoxanstössen verhielt sich die Doppelbrechung ähnlich, wie bei den mit Velbe behandelten Patienten. Nach 3-7 Tagen stieg die Doppelbrechung oft nach vorherigem Abfall unter den Ausgangswert auf ein Maximum an, das etwa dem nach dem 1. Stoß entsprach. Auch Patient Nr.7 verhielt sich diesbezüglich wie die übrigen Patienten.
Mit dem Beginn der Behandlung änderte sich auch hier der

Charakter der Doppelbrechung; jedodh nicht so stark, wie bei den mit Velbe behandelten Patienten, sodaß die Einteilung in die verschiedenen Doppelbrechungsgrade leichter blieb.

Die feinen Strukturen nahmen sehr stark ab.
Die mittleren Strukturen nahmen zu. Sie erschienen insgesamt größer als vor dem ersten Endoxanstoss.

Die groben Strukturen nahmen zu, ihre Polarisationskreuze wurden zwar undeutlicher und zum Teil etwas verschoben, gingen aber fast nie ganz verloren.

Die mit " verklumpt" bezeichneten Strukturen nahmen zu (bis 6%) wurden aber nicht so groß wie bei den mit Velbe behandelten Patienten.

Zu den Kurven B : Mit Ausnahme von Patient Nr.7 lag auch hier, wie bei den mit Velbe behandelten Patienten, die mittlere Doppelbrechung der 6 auf den ersten Endoxanstoß folgenden Tage höher als der Ausgangswert. Bei den weiteren Stößen konnte festgestellt werden:
Lag der Ausgangswert nahe dem Maximalwert, so war ein weiterer Anstieg der Doppelbrechung nicht möglich. Lag aber der Wert deutlich unter dem Maximalwert, so war die mittlere Doppelbrechung der 6 auf den weiteren Stoß folgenden Tage wieder höher oder mindestens gleich wie der Bezugswert. Dies gilt auch für Patient Nr.7, der bei dem 2. Endoxanstoß, wie die anderen Patienten, mit einem Anstieg der Doppelbrechung reagierte.

Zu den Kurven C : Sie zeigten, mit Ausnahme von Patient Nr.7, daß die Mittelwerte, errechnet aus allen Doppelbrechungsindices eines Patienten, während der Behandlung höher liegen, als jene vor der Behandlung.

f) Kritik an den Ergebnissen bei den mit Endoxan behandelten Patienten

Für diejenigen Medikamente, welche die mit dem Endoxan behandelten Patienten noch außerdem erhielten, gilt grundsätzlich dasselbe, was schon bei den mit Velbe behandelten Patienten ausgeführt wurde. Auch hier wurden vor der Endoxanbehandlung keine auffallenden Veränderungen der Doppelbrechung gefunden.
Jedoch hatten auch hier einige Patienten hohe Temperaturen: Patient Nr.9 hatte während der ganzen Behandlung hohes Fieber.
Patient Nr.10 hatte während des 1. Endoxanstoßes bis 4 Tage vor der 2. Endoxangabe hohe Temperatur, wahrscheinlich wegen eines Infektes,bedingt durch die extreme Leukopenie(300 Leukozyten / mm^3),die durch das Zytostatikum hervorgerufen wurde.
Patient Nr.11 wurde zugleich mit der 1. Endoxanbehandlung wegen eines akuten Harnwegsinfektes behandelt.
So muß, wie bei den mit Velbe behandelten Patienten, der extreme Anstieg der Doppelbrechung und ihre starke Schwankung teilweise auf eine Infektion zurückgeführt werden. Jedoch kann auch hier, wie bei den mit Velbe behandelten Patienten, sicher eine Einwirkung des Zytostatikums angenommen werden, da sich die Doppelbrechung während der Behandlung in charakteristischer Weise änderte und niemals die für die akute Entzündung typischen doppelbrechenden Strukturen auftraten.

g) Vergleich der Zunahme der Doppelbrechung bei den mit Endoxan und Velbe behandelten Patienten

In den folgenden zwei Kurven und Tabellen wurden die Kurven C der mit Velbe und Endoxan behandelten Patienten nochmals getrennt aufgetragen (Kurve 1).

Aus diesen wurden nun für jede Patientengruppe gesondert die Mittelwerte aus den Doppelbrechungsindices vor und während der Behandlung zusammengezählt und daraus wieder der Mittelwert bestimmt.(Kurve 2)

Dadurch konnte der Anstieg der Doppelbrechung bei der mit Velbe und der mit Endoxan behandelten Patientengruppe verglichen werden.
Es ergab sich, daß der Doppelbrechungsindex der mit Velbe behandelten Patienten unter der Behandlung um 0,28 zunahm, während bei der mit Endoxan behandelten Patientengruppe die Doppelbrechung mit Patient Nr.7 um 0,16 und ohne Patient Nr.7 um 0,22 zunahm.

Bei den mit Velbe behandelten Patienten nahm also die Doppelbrechung unter der Behandlung etwas stärker zu, als bei den mit Endoxan behandelten Patienten.

Mittelwerte, errechnet aus den Doppelbrechungsindices bei den 4 mit Velbe behandelten Patienten

Tabelle zu Kurve 1

	1. Mittelwerte, errechnet aus den Indices vor der Behandlung	2. Mittelwerte, errechnet aus den Indices während der Behandlung
Pat. Nr. 1	1,90	2.11
Pat. Nr. 2	1.81	1.97
Pat. Nr. 3	1.78	1.90
Pat. Nr. 4	1.52	2.03

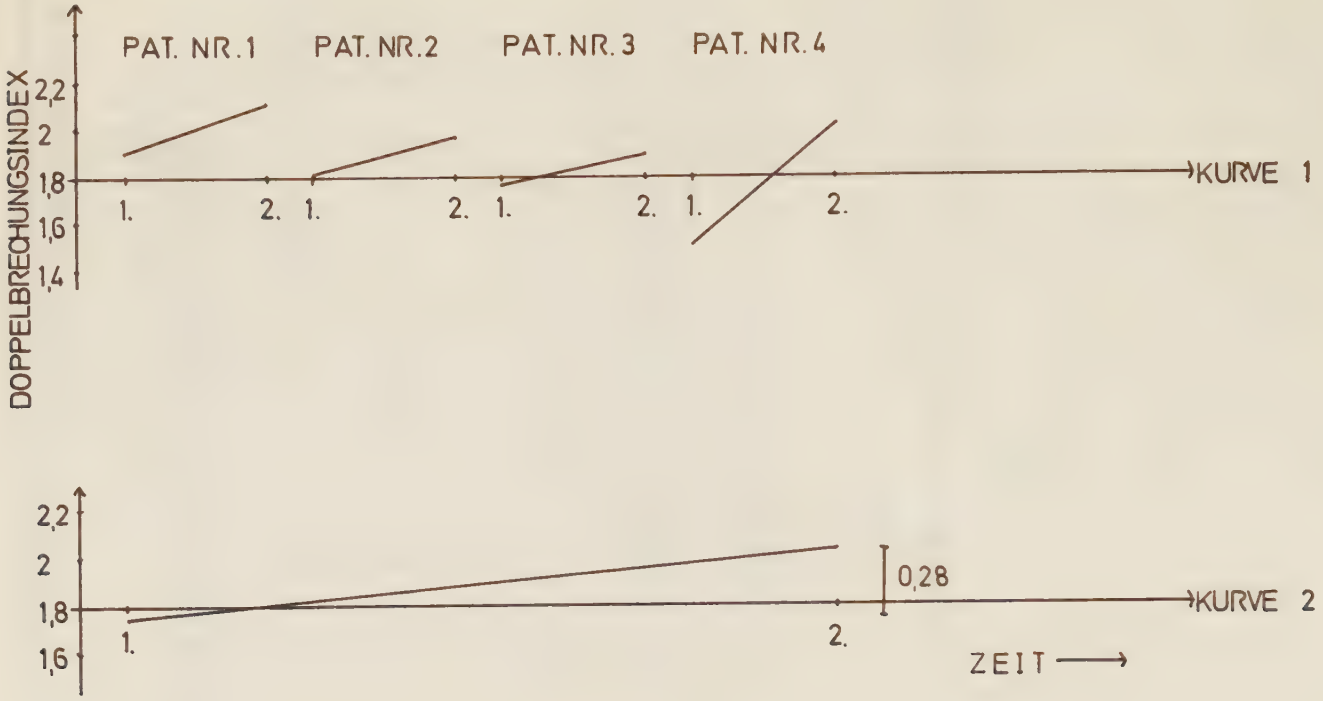
zu Kurve 2

Werden die Mittelwerte aus den Doppelbrechungsindices der 4 Patienten zusammengezählt und daraus wieder der Mittelwert errechnet, so ergibt sich :

	1. vor der Behandlung	2. während der Behandlung
Mittelwert aus Pat.1,+2,+3,+4	1,75	2,03

Das bedeutet eine Zunahme der Doppelbrechung während der Behandlung um :

0,28


PAT. NR. 1
PAT. NR. 2
PAT. NR. 3
PAT. NR. 4
DOPPELBRECHUNGSINDEX
2,2
2
1,8
1,6
1,4
1.
2.
KURVE 1
0,28
ZEIT
KURVE 2

Mittelwerte, errechnet aus den Doppelbrechungsindices bei den 7 mit Endoxan behandelten Patienten

---

T a b e l l e zu K u r v e 1

	1. Mittelwerte, errechnet aus den Indices v o r der Behandlung	2. Mittelwerte, errechnet aus den Indices während der Behandlung
Pat. Nr. 5	1.98	2.01
Pat. Nr. 6	1.57	1.77
Pat. Nr. 7	2.33	1.95
Pat. Nr. 8	1.52	1.56
Pat. Nr. 9	1.59	1.65
Pat. Nr.10	2.14	2.33
Pat. Nr.11	1.86	2.74

zu K u r v e 2

Werden die Mittelwerte aus den Doppelbrechungsindices der 7 Patienten zusammengezählt und daraus wieder der Mittelwert errechnet, so ergibt sich :

	1. v o r der Behandlung	2. w ä h r e n d der Behandlung
Mittelwert aus Pat. 5 - 11	1.84	2.00

Das bedeutet eine Zunahme der Doppelbrechung während der Behandlung um :

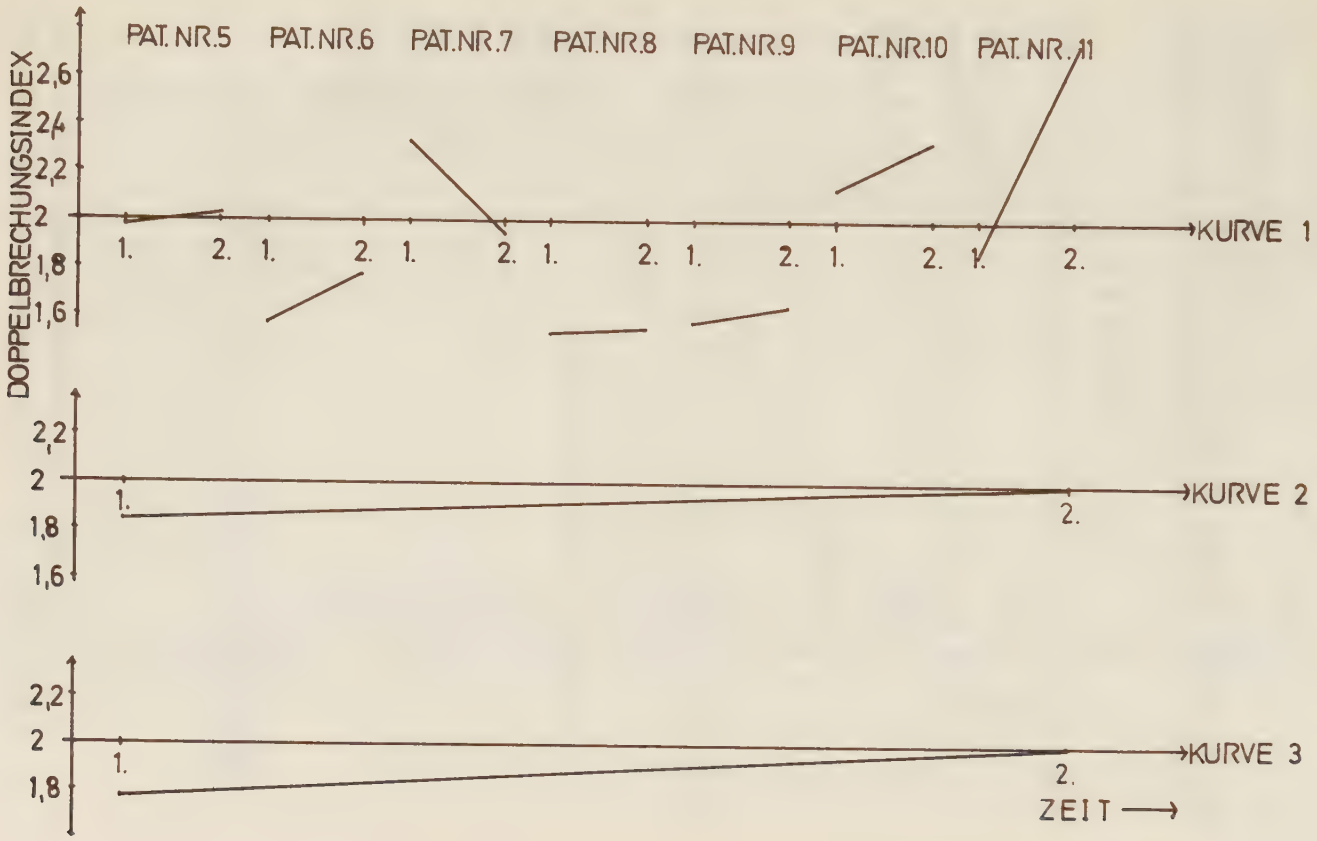
0,16

---

zu K u r v e 3

Wird Pat. Nr.7 nicht berücksichtigt, so nimmt die Doppelbrechung der restlichen 6 Patienten während der Behandlung im Durchschnitt um :

0,22 zu.


PAT. NR.5
PAT. NR.6
PAT. NR.7
PAT. NR.8
PAT. NR.9
PAT. NR.10
PAT. NR. 11
DOPPELBRECHUNGSINDEX
2,6
2,4
2,2
2
1,8
1,6
1.
2.
KURVE 1
KURVE 2
KURVE 3
ZEIT

D Ergebnisse der - in vitro - Versuche

a) Endoxan

Aus den folgenden Kurven mit Tabelle ist im Blut beider Versuchspersonen in allen Kurven eine deutliche Zunahme der Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Zeit zu erkennen. Bei den Versuchspersonen ist die Zunahme der Doppelbrechung mit steigender Färbedauer bei der in-vitro Gabe von 3 mg und 30 mg Endoxan größer, als bei dem Kontrollwert. Die Veränderungen bei der Zugabe von 30 mg Endoxan sind wesentlich stärker, als die bei 3 mg Endoxan, obwohl sich das bei der Auszählung nicht bemerkbar macht, und bei Versuchsperson Nr.1 der Doppelbrechungsindex bei 3 mg Endoxan nach 60 und 90 Minuten sogar größer ist, als der zur selben Zeit bei 30 mg Endoxan.
Das kommt daher, daß bei Zugabe von 30 mg Endoxan mehr die mit "mittel" bezeichneten Strukturen zunehmen,die bei der Auszählung nicht so ins Gewicht fallen. Ihre Größe schwankt zwischen jener der neutrophilen Granula und etwa dem dreifachen davon.Von den groben Strukturen sind sie leicht zu unterscheiden. Manchmal sehen die Zellen siebartig aus.Weiterhin treten bei der Gabe von 30 mg Endoxan nach 60 Minuten schon häufig pyknotische Kernformen auf. Bei der Gabe von 3 mg Endoxan wurden keine Besonderheiten bemerkt.Die Doppelbrechung nahm auf Kosten der feinen Strukturen zu,ohne daß sich ein Doppelbrechungsgrad auffallend vermehrte.
Nach der Gabe von 3 mg und 30 mg Endoxan wurde beidesmal ein deutlicher Anstieg der mit "verklumpt"bezeichneten Strukturen gegenüber dem Kontrollwert festgestellt. Eine Indentität der von R o l l (37) bei Endoxangabe beschriebenen toxischen Granulationen mit einer der oben beschriebenen Strukturen ist nicht wahrscheinlich,da die toxischen Granulationen unter denselben Versuchsbedingungen häufiger und vor allem nicht solchen Größen-und Formschwankungen unterworfen sind.

V.P.Nr.1

Kontrollwert

	15 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.
fein	53	32	10	1
mittel	44	65	79	71
grob	3	3	8	17
grob>3	-	-	-	1
verklumpt	-	-	3	6
Index	1,50	1,71	2,04	2,22

Endoxan 3 mg

fein	53	31	6	-
mittel	45	59	69	39
grob	2	9	20	38
grob>3	-	-	-	2
verklumpt	-	-	5	17
Index	1,49	1,76	2,24	2,68

Endoxan 30 mg

fein	45	20	3	1
mittel	52	71	77	55
grob	2	8	19	31
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	-	1	12
Index	1,55	1,86	2,18	2,52

V.P.Nr.2

Kontrollwert

fein	89	62	25	6
mittel	11	19	62	67
grob	-	3	11	22
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	-	-	3
Index	1,11	1,38	1,82	2,18

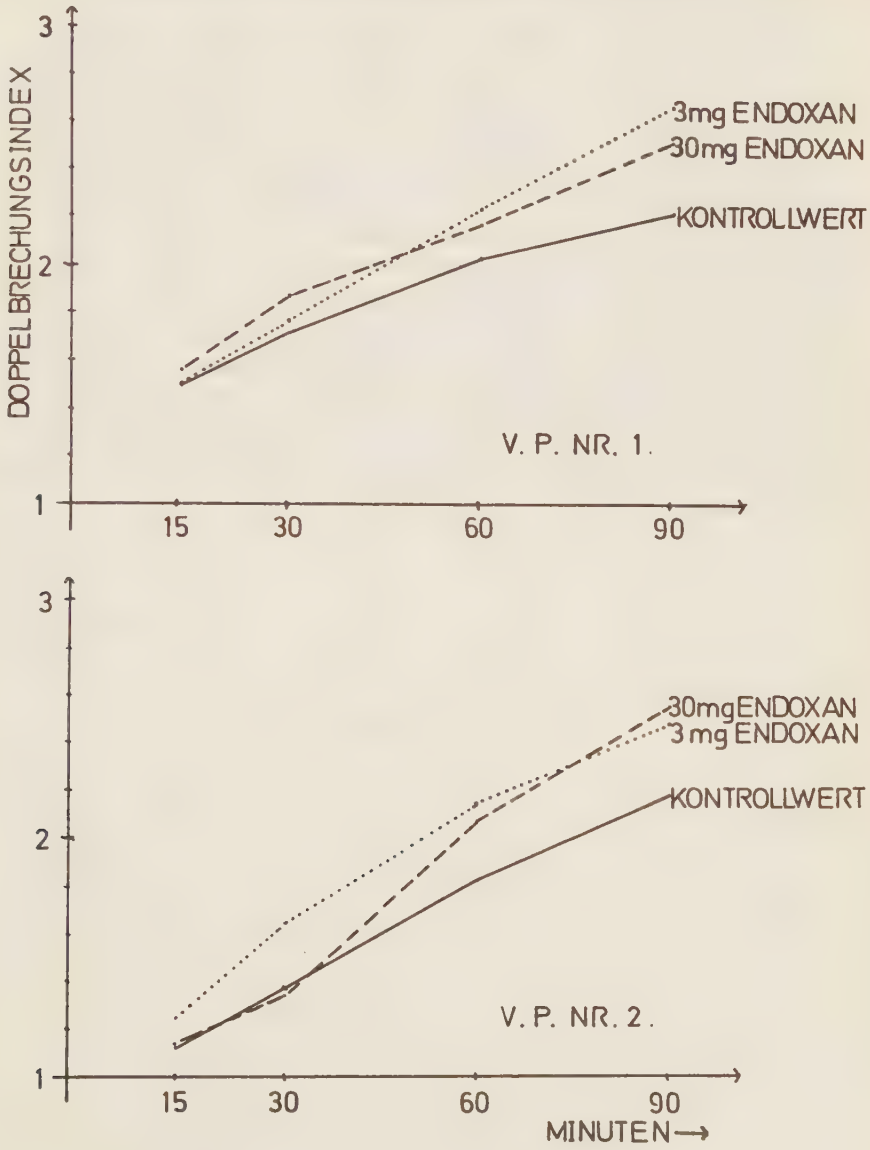
Endoxan 3 mg

fein	76	38	-	-
mittel	20	57	71	57
grob	3	4	24	33
grob>3	-	-	-	1
verklumpt	-	-	-	7
Index	1,25	1,64	2,14	2,45

Endoxan 30 mg

fein	88	58	5	-
mittel	12	39	73	53
grob	-	2	19	33
grob>3	-	-	-	1
verklumpt	-	-	-	11
Index	1,12	1,34	2,08	2,53

DAS VERHALTEN DER DOPPELBRECHUNG BEI DEN IN VITRO VERSUCHEN MIT ENDOXAN



b) Velbe

Aus den folgenden Kurven mit Tabelle ist im Blut beider Versuchspersonen in allen Kurven eine deutliche Zunahme der Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Zeit zu erkennen. Wie bei Endoxan ist die Zunahme der Doppelbrechung bei der invitro Gabe von Velbe größer als bei dem Kontrollwert. Die Veränderungen im Doppelbrechungscharakter entsprechen etwa denen wie bei der Gabe von 3 mg Endoxan. Die Doppelbrechung nimmt auf Kosten der feinen Strukturen zu, ohne daß sich ein Doppelbechungsgrad auffallend vermehrt. Die groben Strukturen behielten, im Gegensatz zu denen in den Leukozyten der mit Velbe behandelten Patienten, im allgemeinen ihre Polarisationskreuze bei, erschienen aber zum Teil etwas verschoben. Nach der Zugabe von Velbe in vitro wurde bei beiden Versuchspersonen eine Vermehrung der mit " verklumpt" bezeichneten Strukturen gegenüber dem Kontrollwert festgestellt.

V.P. Nr.1

Kontrollwert

	15 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.
fein	53	32	10	1
mittel	44	65	79	71
grob	3	3	8	17
grob>3	-	-	-	1
verklumpt	-	-	3	6
Index	1,50	1,71	2,04	2,22

Velbe 0,1 mg

fein	46	37	8	1
mittel	49	53	71	55
grob	3	8	14	26
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	1	7	16
Index	1,52	1,71	2,20	2,53

V.P. Nr. 2

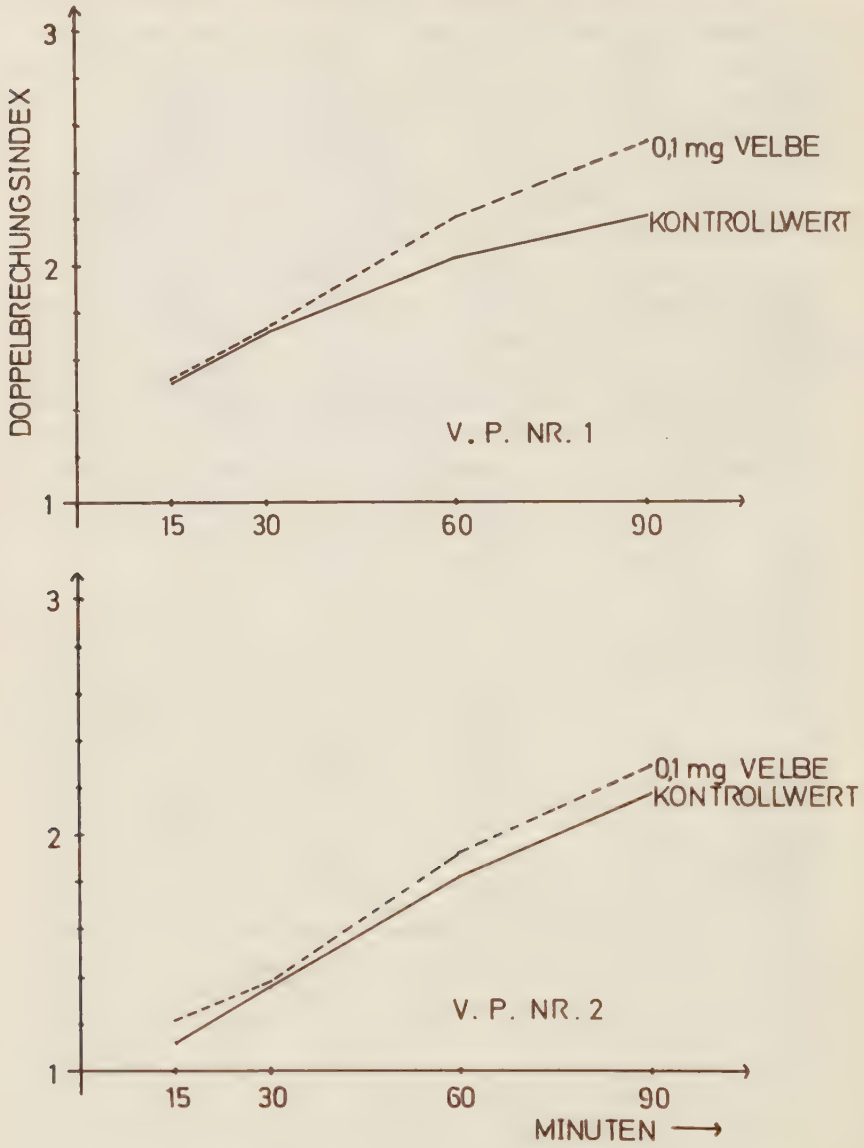
Kontrollwert

fein	89	62	25	6
mittel	11	19	62	67
grob	-	3	11	22
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	-	-	3
Index	1,11	1,38	1,82	2,18

Velbe 0,1 mg

fein	80	65	24	5
mittel	19	28	60	65
grob	1	5	12	18
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	-	3	10
Index	1,21	1,38	1,92	2,29

DAS VERHALTEN DER DOPPELBRECHUNG BEI DEN IN VITRO VERSUCHEN MIT VELBE

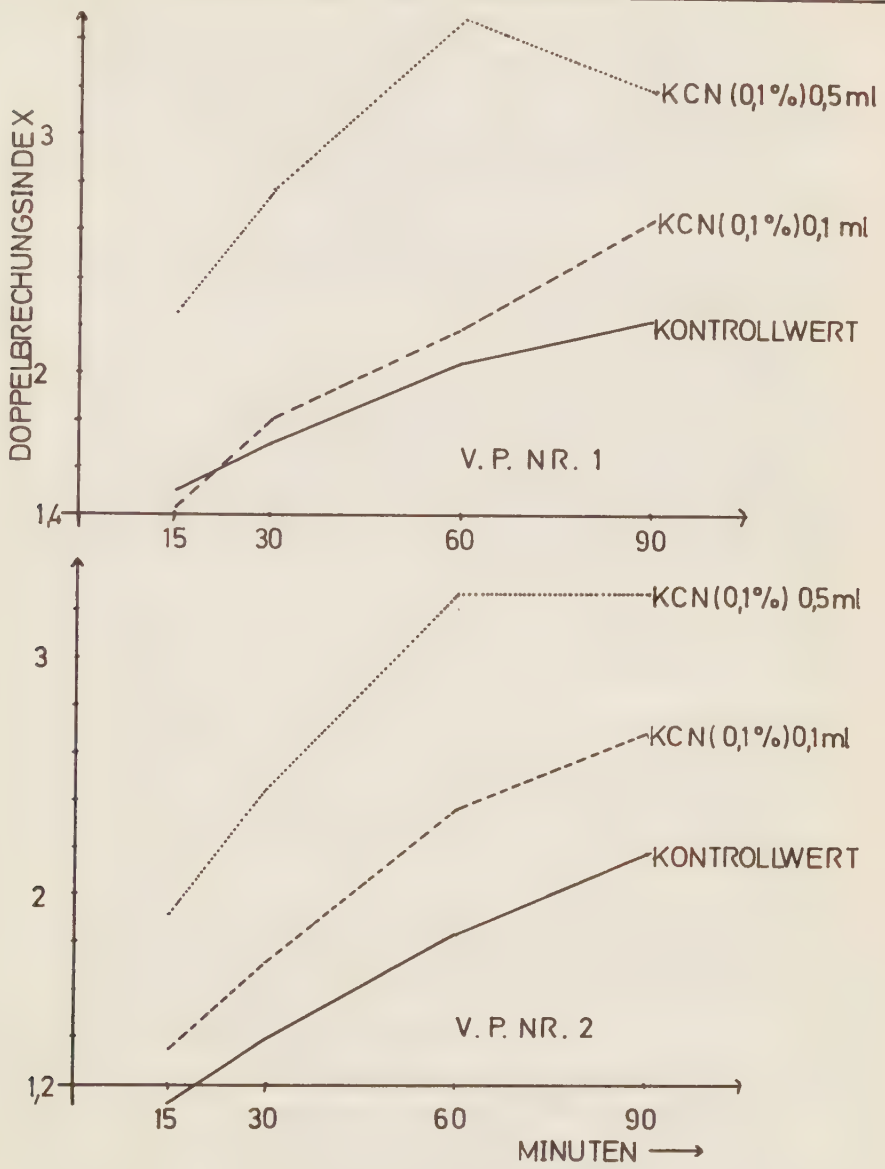


c) K C N

Aus den folgenden Kurven mit Tabelle ist im Blut beider Versuchspersonen eine deutliche Zunahme der Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Zeit zu erkennen. Bei beiden Versuchspersonen ist die Zunahme der Doppelbrechung bei der invitro Gabe von 0,1 ml KCN größer als bei dem Kontrollwert. Bei der Gabe von 0,5 ml KCN erreicht die Doppelbrechung schon nach 30 Minuten extreme Grade, nach 60 Minuten ist das Maximum erreicht.
Auffallend ist hier besonders bei der Gabe von 0,5 ml KCN die starke Zunahme der mit "verklumpt" bezeichneten Strukturen. Diese können so groß werden, daß sie das halbe Protoplasma des Leukozyten einnehmen.

V.P. Nr.1	15 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.
		Kontrollwert		
fein	53	32	10	1
mittel	44	65	79	71
grob	3	3	8	17
grob>3	-	-	-	1
verklumpt	-	-	3	6
Index	1,50	1,71	2,04	2,22
		K C N (0,1%) 0,1 ml		
fein	62	26	7	-
mittel	34	67	73	46
grob	4	5	15	34
grob>3	-	-	-	1
verklumpt	-	-	5	17
Index	1,42	1,80	2,18	2,66
		K C N(0,1%) 0,5 ml		
fein	20	8	2	-
mittel	42	26	18	22
grob	32	40	8	30
grob>3	2	4	2	4
verklumpt	4	20	70	42
Index	2,24	2,76	3,50	3,18
V.P. Nr. 2		Kontrollwert		
fein	89	62	25	6
mittel	11	19	62	67
grob	-	3	11	22
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	-	-	3
Index	1,11	1,38	1,82	2,18
		K C N(0,1%) 0,1 ml		
fein	69	43	-	-
mittel	25	45	70	49
grob	5	10	16	29
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	-	-	12	21
Index	1,34	1,63	2,36	2,69
		K C N(0,1%) 0,5 ml		
fein	30	3	2	4
mittel	50	57	28	18
grob	20	29	34	24
grob>3	-	2	18	20
verklumpt	-	8	24	34
Index	1,90	2.44	3,28	3,28

DAS VERHALTEN DER DOPPELBRECHUNG BEI DEN IN VITRO VERSUCHEN MIT KCN



d) Hydrocortison

Eine Zu-oder Abnahme der Doppelbrechung bei den in vitro Versuchen mit Cortisol gegenüber den Kontrollwerten konnte nicht festgestellt werden. Auch im Charakter der Doppelbrechung wurden keine Veränderungen gesehen. Interessanterweise entwickelten sich, wenn zu den 2 ml Citratblut 50% Aethylalkohol in Dosen von 0,2 ml zugesetzt wurde, beinahme keine doppelbrechenden Strukturen, obwohl Kerne und Protoplasma unverändert blau angefärbt waren. Bei 0,025 ml Alkohol pro 2 ml Citratblut konnte eine Veränderung der Doppelbrechung gegenüber dem Kontrollwert ohne Alkohol nicht mehr festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen hinsichtlich einer Hemmung der Doppelbrechung wurde bei Butazolidin in Dosen von 0,1 ml gemacht. Auch hier entwickelte sich beinahe keine Doppelbrechung, das Plasma war auffallend blassblau und die Kerne z.T. zerstört.

e) Tuschespeicherung

Die doppelbrechenden Strukturen in den polymorphkernigen Leukozyten sind auch bei dem hier benutzten defibrinierten Blut dieselben wie bei dem Citratblut.
Ein paar leichte Veränderungen liessen sich feststellen:

Die mittleren Strukturen nahmen an Größe nicht,aber an Zahl etwas zu.

Die groben Strukturen hatten meist keine schönen Polkreuze, diese waren häufig asymmetrisch verschoben, fehlten jedoch nie ganz.

Die mit "verklumpt"bezeichneten Strukturen waren geringgradig vermehrt.

Die folgenden Kurven mit Tabelle zeigen im Blut beider Versuchspersonen die zeitliche Verschiebung zwischen der Entstehung der Doppelbrechung und der Tuschephagozytose: Während nach 60 Minuten die Tuschespeicherung schon abgeschlossen ist, steigt die Doppelbrechung bei der 1.Versuchsperson bis zu 90 Minuten an und sinkt dann wieder ab. Bei der 2. Versuchsperson steigt die Doppelbrechung sogar während 120 Minuten an.
Im Blut der Versuchsperson 2 zeigt sich bei Zugabe von KCN(0,3 ml) eine starke Zunahme der Doppelbrechung gegenüber dem Kontrollwert, während die Tuschespeicherung durch die KCN-Gabe gegenüber dem Kontrollwert geringer wird.
Die Einlagerung von Tusche und die gerichtete Einlagerung von Toluidinblau in die Zelle scheint also an verschiedenen Stellen durch unterschiedliche Mechanismen vor sich zu gehen.
Dafür gibt es weitere Hinweise :

1) Die Lage : Die doppelbrechenden Strukturen, besonders vom Typ "grob",liegen meist peripher im Protoplasma, während die phagozytierten Tuscheteilchen in derselben Größenordnung meist näher am Zellkern liegen.

2) Die Form : Der Farbstoff in den groben Strukturen erscheint im unpolarisierten Licht in Ringform eingelagert; in der Mitte des Ringes zeigt sich dabei eine Aufhellung. Die Tusche wird in massiver Form eingelagert.

3) In den doppelbrechenden Strukturen wurden nie Tuschepartikelchen gefunden.

4) Die Monozyten zeigen eine sehr starke Tuschespeicherung, aber keine nennenswerte Doppelbrechung.

V.P. Nr.1

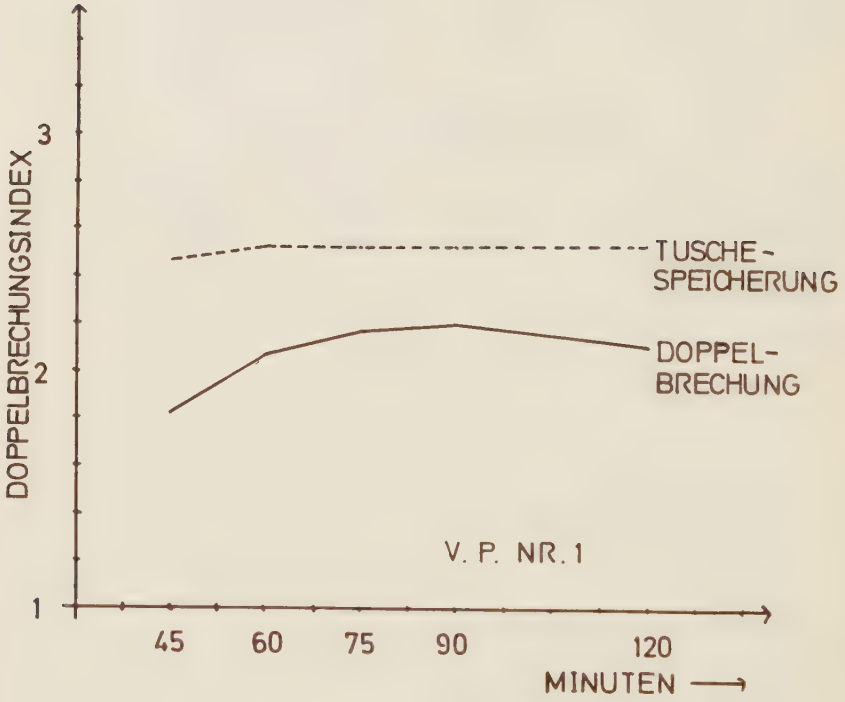
Doppelbrechung

	45 Min.	60 Min.	75 Min.	90 Min.	120 Min.
fein	34	18	13	13	14
mittel	46	56	52	59	58
grob	17	20	25	23	19
grob)3	-	1	1	1	-
verklumpt	1	3	5	4	6
Index	1,81	2,06	2,16	2,20	2,11

Tuschespeicherung

nicht	7	5	8	7	6
mittel	47	42	39	40	39
groß	42	48	48	48	51
verklumpt	5	5	5	5	4
Index	2,47	2,53	2,50	2,51	2,53

DAS VERHALTEN VON DOPPELBRECHUNG UND TUSCHESPEICHERUNG BEI DEN IN VITRO VERSUCHEN



V.P. Nr.2

Doppelbrechung ohne K C N

	45 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.
fein	73	39	30	22
mittel	25	51	56	50
grob	-	6	8	15
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	2	4	6	13
Index	1,31	1,75	1,90	2,19

Doppelbrechung nach 0,3 ml K C N (0,1%)

fein	26	20	12	8
mittel	50	50	50	62
grob	10	12	18	12
grob>3	-	-	-	-
verklumpt	14	18	20	18
Index	2,12	2,28	2,46	2,40

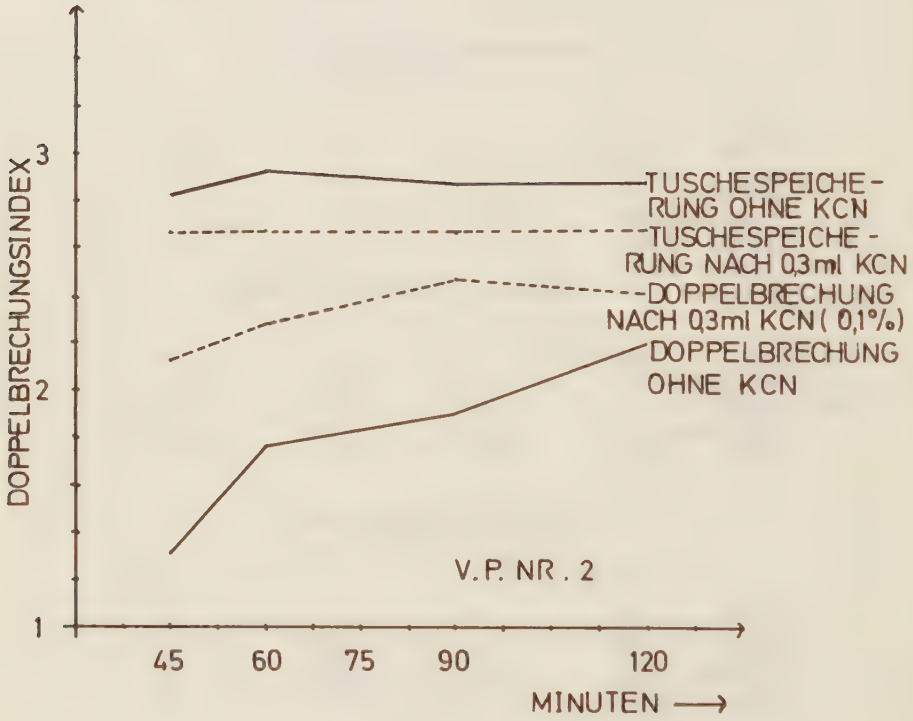
Tuschespeicherung ohne KCN

nicht	7	4	3	3
mittel	31	30	35	34
groß	35	36	35	35
verklumpt	27	30	27	28
Index	2,82	2,92	2,86	2,88

Tuschespeicherung nach 0,3 ml K C N(0,1%)

nicht	8	6	6	6
mittel	36	41	40	40
groß	38	34	36	35
verklumpt	18	19	18	19
Index	2,66	2,66	2,66	2,67

DAS VERHALTEN VON DOPPELBRECHUNG UND TUSCHE-SPEICHERUNG BEI DEN IN VITRO VERSUCHEN MIT U. OHNE KCN



E Diskussion

a) Der Einfluß von Velbe und Endoxan auf die doppelbrechenden Strukturen der peripheren neutrophilen Granulozyten

Bei elf Patienten,von denen 4 das Cytostatikum Velbe (Vinblastinsulfat) und 7 das Cytostatikum Endoxan (Cyclophosphamid) als Stoßtherapie erhielten, konnte eine Veränderung der von M i s s m a h l beschriebenen doppelbrechenden Strukturen,die nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau im Protoplasma neutrophiler Granulozyten auftreten,festgestellt werden. Die Veränderungen sind qualitativer und quantitativer Natur.
Qualitativ : Die Art der Doppelbrechung bei den mit Zytostatika behandelten Patienten ist von der vor der Behandlung und der gesunder Versuchspersonen einerseits, und von der bei akuten Entzündungen andererseits, deutlich zu unterscheiden.
Bei den hier beobachteten Patienten überwiegt vor der Behandlung ebenso wie bei gesunden Personen der Doppelbrechungsgrad "fein". Die groben und mittleren Strukturen sind auf Grund der gut ausgebildeten Polarisationskreuze leicht zu unterscheiden. Die mit "verklumpt" bezeichneten Strukturen sind sehr selten.
Bei akuten Entzündungen können die groben Strukturen extrem zunehmen. Sie haben alle deutlich ausgebildete Polarisationskreuze. Die mit "verklumpt" bezeichneten Strukturen kommen hier fast nie vor.
Unter der Zytostatikabehandlung, besonders unter Velbe, fällt bei den groben Strukturen auf,daß die Polarisationskreuze undeutlich werden,oder sogar ganz verschinden; dazu kommt die Zunahme der mit"verklumpt"bezeichneten Strukturen.

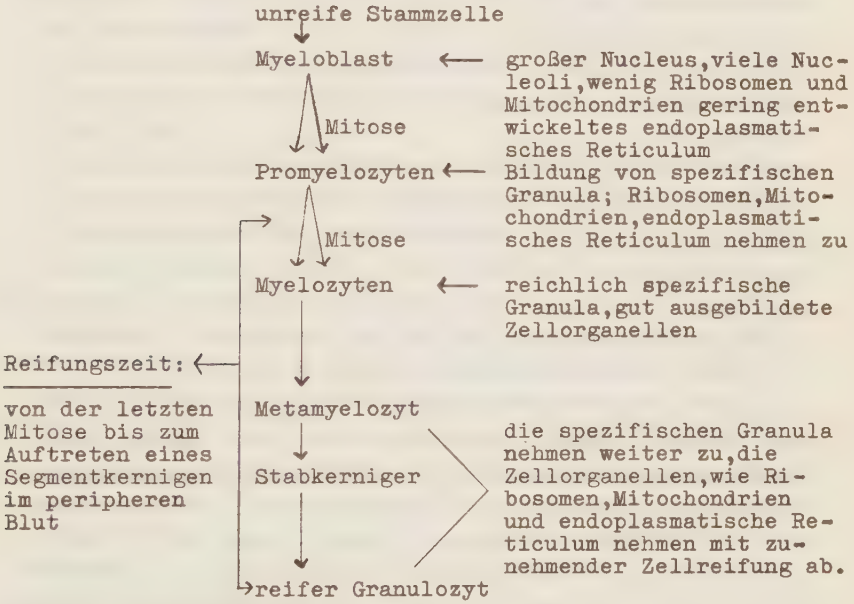
Von staubfeiner Doppelbrechung bis zu solchen Strukturen, die ein Drittel des Protoplasmas einer Zelle einnehmen, können alle Übergänge vorkommen, sodaß die Beurteilung der Ausstriche wesentlich schwieriger wird. Bei Endoxan sind die Vorgänge ähnlich, jedoch nicht so ausgeprägt.

Quantitativ : Nach dem 1. Zytostatikastoß beginnen die Doppelbrechungsindices von Tag zu Tag sehr stark zu schwanken. Insgesamt wurde eine Zunahme der Doppelbrechung beobachtet. Der mit Endoxan behandelte Patient Nr.7 macht davon die einzige Ausnahme. Nach dem 2.Zytostatikastoß jedoch nimmt auch bei ihm, wie bei den übrigen Patienten die Doppelbrechung zu.
Bei den mit Velbe behandelten Patienten wurde ein maximaler Anstieg der Doppelbrechung 4-7 Tage nach einem Velbestoß beobachtet. Bei den mit Endoxan behandelten Patienten nach 3-7 Tagen; jedoch konnte bei diesen nicht dieselbe Regelmäßigkeit wie bei den mit Velbe behandelten Patienten festgestellt werden. Hier kann ein maximaler Anstieg der Doppelbrechung bereits am Tage nach der Endoxangabe auftreten. Aus den Versuchsergebnisses geht hervor, daß die Doppelbrechung während der Endoxanbehandlung etwas geringer ansteigt als während der Velbebehandlung. Dies entspricht dem subjektiven Eindruck beim Durchmustern der Präparate, wonach die unter der Behandlung von Velbe auftretenden Veränderungen auffälliger sind, als die unter Endoxan.

b) Der Einfluß der Zytostatika auf das Knochenmark

Im folgenden Schema soll zunächst auf die Entwicklung und Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten eingegangen werden:

Entwicklung und Reifung der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark :(15)



Das Myelozytenstadium soll durchschnittlich 2,9 Tage betragen. Die Reifungszeit soll je nach Bestimmungsmethode 3 1/2 bis 4 1/2 oder 8,5 ± 1,4 Tage betragen.(4;13) Für den Verbleib eines neutrophilen Granulozyten in der Blutbahn wird eine Zeitspanne von beliebig kurz bis maximal

24-30 Stunden angegeben.Die mittlere Verweildauer eines Granulozyten in der Blutbahn beträgt 10,4 Stunden.(4;13) Daraus ergibt sich für die Veränderungen der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut folgendes :
Treten diese sofort nach der Gabe eines Medikamentes auf, und bleiben sie nicht länger, als es der Verweildauer des Medikamentes im Blut + 10,4 Stunden entspricht, so kann das Medikament nur das periphere Blut oder die ältesten Stadien des Knochenmarkes,die kurz vor der Ausschwemmung standen, beeinflußt haben.Treten die Veränderungen später auf, so muß eine Entwicklungsstufe im Knochenmark beeinflußt worden sein, und zwar eine umso jüngere,je später sich die Veränderungen im peripheren Blut zeigen.
Bei Velbe tritt das Maximum der Doppelbrechung meist 4-7 Tage nach einer stoßweisen Gabe des Zytostatikums auf.Vorher zeigt sich nur eine geringe Veränderung der Doppelbrechung.Es wird sich hier also im wesentlichen um eine Beeinflussung des Knochenmarkes handeln,und zwar nicht nur quantitativer Natur,wie ja aus der stets auftretenden Leukopenie bekannt ist,sondern auch qualitativer(20).
Daß sich diese qualitative Veränderung auch im peripheren Blut bemerkbar macht, kann an den als"grob" bezeichneten doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma neutrophiler Granulozyten gezeigt werden. Bei gesunden Versuchspersonen handelt es sich bei diesen doppelbrechenden Strukturen um kreisrunde geschichtete Lamellensysteme, in die das Toluidinblau gerichtet eingelagert ist. Im Polarisationsmikroskop imponieren diese dann durch ihre schön ausgebildeten Polarisationskreuze. Bei den mit Velbe behandelten Patienten verlieren diese Lamellensysteme ihre Kreisform,ihre Gestalt wird unregelmäßiger. Dadurch verlieren sie ihre deutlichen Polarisationskreuze, diese erscheinen verschoben und an den Rand gedrückt ; zum Teil verschwinden sie auch ganz. Manche dieser Lamellensysteme können bis ein Drittel des Protoplasmas einnehmen und sehen im

Polarisationsmikroskop wie mehrere ineinandergeschobene verklumpte Polarisationskreuze aus.
In welchem Stadium der Reifung Velbe die Blutzellen beeinflußt,kann aus den Ergebnissen nicht gesagt werden; jedoch kann aus dem Anstieg der Doppelbrechung geschlossen werden, daß es sich um Granulozyten handelt, die zum Zeitpunkt der Einwirkung von Velbe in einem Stadium waren, das 4-7 Tage vor der Ausschwemmung aus dem Knochenmark stand. Nach dem oben angegebenen Schema entspricht diese Zeit etwa der Reifungszeit der neutrophilen Granulozyten. Da Velbe ein Mitosegift ist, wäre es möglich, daß die Veränderung der Doppelbrechung nach einem Velbestoß mit einer gestörten Teilung vom Promyelozyten zum Myelozyten zusammenhängt.
Das Zytostatikum Endoxan verursacht eine zeitlich weniger genau lokalisierte Zunahme der Doppelbrechung,auch die qualitativen Veränderungen der doppelbrechenden Strukturen sind nicht so ausgeprägt. Das Maximum der Zunahme liegt meist bei 3-7 Tagen,kann jedoch auch am 1.Tag nach der Endoxangabe auftreten. Hier ist also ein direkter Einfluß auf die peripheren Blutzellen möglich. Aus Versuchen an Ratten geht hervor, daß Endoxan 24 Stunden nach der Injektion in Blut und Serum nicht mehr nachweisbar ist,d.h. nach spätestens 34 Stunden müsste,wenn Endoxan nur das periphere Blut beeinflussen würde, die Veränderung zurückgebildet sein. Da die Veränderungen wesentlich länger andauern, kann auch hier eine Beeinflussung des Knochenmarks angenommen werden.
Zusammenfassend kann über Velbe und Endoxan folgendes gesagt werden: Die nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau in den Leukozyten auftretenden doppelbrechenden Strukturen werden durch beide Zytostatika quantitativ und qualitativ verändert. Die Veränderung ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Einwirkung der Zytostatika auf

auf die Zellen des Knochenmarkes zurückzuführen. Da die Doppelbrechung an einen bestimmten strukturellen Aufbau gebunden ist, so kann aus ihrer Veränderung unter der Zytostatikatherapie eine Änderung der die Doppelbrechung hervorrufenden protoplastischen Strukturen angenommen werden.

C) Besprechung eines Zusammenhanges zwischen der Zunahme der Doppelbrechung im Protoplasma der neutrophilen Granulozyten und einer Schädigung dieser Zellen anhand der in Vitro-Versuche

Werden Velbe und Endoxan in hohen Dosen zusammen mit Blut von gesunden Versuchspersonen und wässriger Toluidinblaulösung inkubiert, so entwickeln sich innerhalb von 90 Minuten dieselben Veränderungen der Doppelbrechung,wie bei den mit Zytostatika behandelten Patienten: Die Doppelbrechung nimmt insgesamt zu und die groben Strukturen werden unregelmäßiger. Eine extreme Zunahme der Doppelbrechung, besonders der mit "verklumpt" bezeichneten Strukturen, kann bei Zugabe von KCN erreicht werden. Ohne Zugabe differenter Substanzen, tritt eine Zunahme der Doppelbrechung allein durch Inkubieren der Blutzellen einer beliebigen Versuchsperson mit Toluidinblau bei steigender Färbedauer auf.(29;39)

Aus diesen Beispielen kann ein Zusammenhang der Entstehung der Doppelbrechung bei neutrophilen Granulozyten und der Schädigung dieser Zellen vermutet werden. Das gilt für die in vitro, wie für die in vivo Versuche, wie an folgenden Beispielen gezeigt werden kann.

1) Velbe und Endoxan haben zwar ihre Hauptwirkung auf schnell wachsende Gewebe,was sich auch am Knochenmark durch die stets auftretende Leukopenie zeigt,aber auch alle übrigen Gewebe werden in unterschiedlichem Maße durch die stoff-

wechselschädigende Wirkung dieser Zytostika beeinträchtigt.

2) KCN schädigt die Zellen sehr stark durch seine Wirkung auf die Atmungskette.

3) Bei Inkubation des Blutes für längere Zeit werden die Zellen durch den Sauerstoffmangel geschädigt.

4) Die bei den neutrophilen Granulozyten der mit Zytostatika behandelten $P_a$tienten auftretenden Veränderungen können in ähnlicher Weise gedeutet werden : Durch den schädlichen Einfluß der Zytostatika auf das Knochenmark werden neutrophile Granulozyten gebildet, die nicht so lebenstüchtig sind, wie die von gesunden Versuchspersonen. Als Zeichen einer verminderten Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse wäre dann die bei der Supravitalfärbung vermehrt auftretende Doppelbrechung aufzufassen.

d) Diskussion der Lysosomennatur der mit " grob" und " verklumpt" bezeichneten doppelbrechenden Strukturen

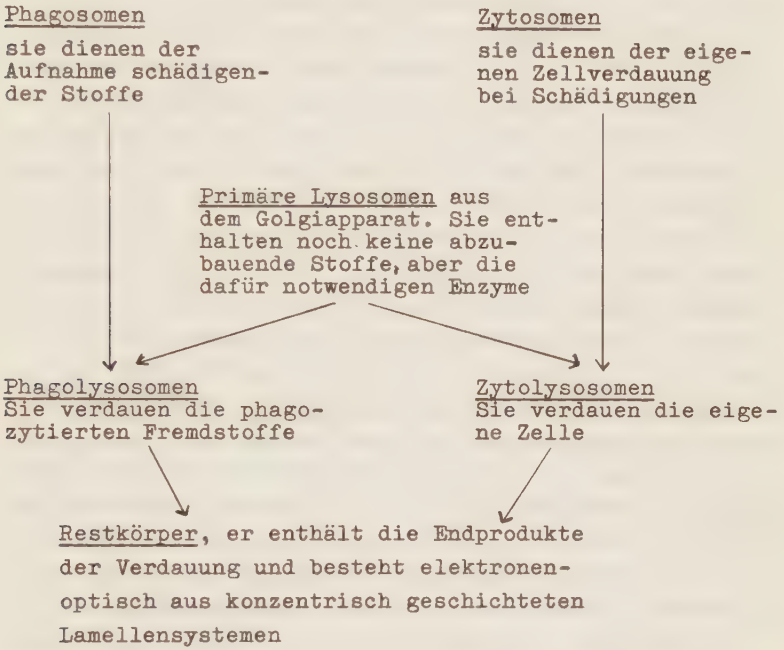
Der Begriff Lysosomen wurde 1955 von de D u v e geprägt. Er verstand darunter Zellorganellen, die einen Teil des intrazellulären Verdauungsapparates darstellen. Sie sind besonders häufig in Leber, Niere, Milz und in den Leukozyten und haben bestimmte Eigenschaften.(11)

1) Eine Größe zwischen 0,2 und 0,6 μ
2) Einen hohen Gehalt an leicht löslichen hydrolytischen Enzymen, mit einem Wirkungsoptimum im sauren Bereich.
3) Das Fehlen eines oxydativen Stoffwechsels
4) Umscheidung mit einer Lipoproteidmembran
5) Bestimmte Möglichkeiten diese Membran zu zerstören und damit die Enzyme freizusetzen.

1956 wurden diese Organellen von N o v i k o f f elektronenoptisch durch Anfärbung der sauren Phosphatasen nachgewiesen.(32)

Die Organellen haben eine sehr unterschiedliche Größe von 0,2 - 0,6µ verwirrender Polymorphie.
Sie haben im elektronenoptischen Bild eine dreischichtige Membran, sind rund bis oval; auch bizarre Formen kommen vor. Von fast leeren Säckchen, bis zu elektronendichten Körpern bestehen alle Übergänge. Häufig finden sich geschichtete Lamellensysteme ,sogenannte Myelinfiguren oder Restkörper. Die Lamellen füllen einen Körper ganz oder teilweise aus. Sie werden als Endprodukte der Phagozytose aufgefasst,(28) besonders häufig sind sie in degenerierenden Zellen.(15) Eine enge Verwandtschaft wird zwischen dem Golgiapparat und den Lysosomen angenommen.(32) Die Lysosomen spielen eine Rolle bei der Phagozytose,Zellabwehr und Zellverdauung. Für ihre Arbeitsweise wird folgendes Schema angenommen :(28)

(Schematische Darstellung der Lysosomen (nach M e r k e r) (28)



Eine Schädigung der Lysosomenmembran tritt besonders auf bei: (28)

Hypoxämie, Anoxämie
Schock (1)
Säuerung des Milieus
Einwirkung von ionisierenden Strahlen(43)
Vitamin A-Überdosierung (8)
Vitamin E-Mangel

Cortison hat in vivo und in vitro einen Schutzeffekt auf die Lysosomenmembran (12; 27; 43). Interessanterweise konnte dieser Effekt bei den neutrophilen Granulozyten nicht festgestellt werden.(7)

Folgende Tatsachen sprechen dafür, daß es sich bei den "groben" und den mit "verklumpt" bezeichneten Strukturen um die von den Elektronenoptikern als sogenannte Restkörper bezeichnete Strukturen handelt :

1) Beide Strukturen liegen in derselben Größenordnung vor.
2) Beide sind aus geschichteten Lamellensystemen aufgebaut, wobei die Lamellensysteme von den Elektronenoptikern als aus Myelin, einem Lipoproteid, bestehenden Figuren angesprochen werden. Nach polarisationsoptischen Untersuchungen von M i s s m a h l handelt es sich bei den mit grob bezeichneten Strukturen ebenfalls um Lipoproteidlamellen. An Modellversuchen konnte er zeigen,daß reine Lipoidlamellen einen radiären Aufbau zeigen, während Lipoproteidmembranen zirkulär aufgebaut sind wie die mit "grob" bezeichneten Strukturen.(30)
3) Beide kommen vermehrt in geschädigten Zellen vor.
4) Aus dem Phagozytoseversuch mit Tusche kann geschlossen werden, daß es sich bei den "groben" und den mit " verklumpt" bezeichneten Strukturen um Endprodukte autolytischer Prozesse handelt, die mit den "Zytolysomen" zu tun haben,d.h. nur mit der eigenen Zellverdauung. Und zwar deshalb, weil in den groben Strukturen nie Tuscheteilchen gefunden wurden. Die Tusche wird, wie aus dem Schema(s.Seite 61) hervorgeht, durch Phagosomen aufgenommen und in den Phagolysosomen verarbeitet. Als weiteren Hinweis dafür folgende Beobachtungen :
   a) Die Doppelbrechung steigt weiterhin an, wenn die Tuschespeicherung wahrscheinlich aus Energiemangel schon abgeschlossen ist.
   b) Bei starker Zellschädigung durch KCN,wie es hier in einem -in Vitro-Versuch durchgeführt wurde, steigt zwar die Doppelbrechung extrem an, die Tuschespeicherung ist jedoch wesentlich geringer.

Der Versuch, durch Hydrocortison einen Schutzeffekt auf die Lysosomen auszuüben, der sich durch eine Verringerung der Restkörper, d.h. der doppelbrechenden Strukturen in den polymorphkernigen Leukozyten gegenüber dem Kontrollwert hätte zeigen sollen, mißlang. Ein signifikanter Unterschied in der Doppelbrechung zwischen mit Hydrocortison inkubierten Blut und einem Kontrollwert konnte nicht gefunden werden.
Möglicherweise gibt es hierfür methodische Ursachen. Andere Untersucher inkubierten Zellkulturen bis zu 3 Tagen in einem Nährmedium zusammen mit Hydrocortison, ehe sie die Zellen schädigenden Einflüssen aussetzten.(43) Allerdings konnte auch C o h n an neutrophilen Granulozyten keinen Schutzeffekt des Hydrocortison auf die Lysosomen feststellen.(7)
Ob die feinen und mittleren doppelbrechenden Strukturen mit anderen Lysosomentypen etwas zu tun haben, wie z.B. den "multivesiculated bodies", "dense bodies"(32) oder den primären Lysosomen, kann hier nicht entschieden werden. M i s s m a h l gibt auch für diese Strukturen geschichtete Lamellensysteme an. Elektronenoptisch gibt es jedoch für Lamellensysteme bei Strukturen dieser Größenordnung keinen Anhalt.
Ein Nachweis dafür, daß die feinen und mittleren doppelbrechenden Strukturen mit den von C o h n als Lysosomen beschriebenen neutrophilen Granula der granulierten Leukozyten identisch sind, konnte nicht erbracht werden.(6)

F Zusammenfassung

Bei polarisationsoptischen Untersuchungen von supravital mit Toluidinblau gefärbtem Blut wurden von M i s s m a h l im Protoplasma der neutrophilen Granulozyten hell aufleuchtende Strukturen gefunden. Diese Strukturen können je nach Größe in grobe, mittlere und feine unterteilt werden. Für gesunde Versuchspersonen können Normwerte aufgestellt werden.

1) Bei 11 mit den Zytostatika Velbe (Vinblastinsulfat) oder Endoxan (Cyclophosphamid) behandelten Patienten wurden die doppelbrechenden Strukturen über einen längeren Zeitraum vor und nach einem Zytostatikastoß beobachtet. Dabei konnten quantitative und qualitative Veränderungen beobachtet werden.

a) Quantitativ : 4-7 Tage nach einem Velbestoß und etwa 3-7 Tage nach einem Endoxanstoß nehmen die groben und mittleren doppelbrechenden Strukturen auf Kosten der feinen bis zu einem für jeden Patienten individuell verschiedenen Maximum zu. Sie nehmen dann wieder ab, um bei einem erneuten Zytostatikastoß wieder anzusteigen.

b) Qualitativ : Die doppelbrechenden Strukturen, die bei der Zytostatikabehandlung auftraten, sind deutlich zu unterscheiden von den Strukturen, die bei gesunden Menschen und bei akuten Entzündungen zu finden sind. Unter der Zytostatikabehandlung, besonders mit Velbe, verlieren die groben Strukturen ihre regelmäßige Form. Sie werden bizarr und können bis zu einem Drittel des Protoplasmas einnehmen. Für diese doppelbrechenden Strukturen wurde der Begriff " verklumpt" eingeführt.

2) Da die Zunahme und Veränderung der Doppelbrechung im allgemeinen erst einige Tage nach einem Zytostatikastoß auftritt, muß angenommen werden, daß durch den schädigenden Einfluß der Zytostatika auf das Knochenmark aus diesem neutrophile Granulozyten abgegeben werden, deren Protoplasma sich während der Färbung mit Toluidinblau anders verhält, als das unbehandelter Patienten . In welchem Stadium der Reifung die Granulozyten beeinflusst werden, kann nicht gesagt werden.

3) An -in Vitro-Versuchen, bei denen Blut von gesunden Personen mit Endoxan, Velbe und KCN inkubiert wurde, konnte eine stärkere Zunahme der Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer als bei den Kontrollen gefunden werden. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Zunahme der Doppelbrechung einer verstärken Zellschädigung entsprecht.

4) Die Lysosomennatur der groben und der mit "verklumpt" bezeichneten doppelbrechenden Strukturen wurde diskutiert. Auf Grund des gleichen Aufbaues aus geschichteten Lamellensystemen wurde die Identität der groben doppelbrechenden Strukturen mit den in elektronenoptischen Aufnahmen als Restkörper beschriebenen Strukturen diskutiert. Beide sind im Protoplasma geschädigter Zellen vermehrt; beide bestehen aus Lipoproteidlamellen.

5) Durch Phagozytoseversuche mit Tuschepartikeln konnte gezeigt werden, daß die Zunahme der Doppelbrechung wahrscheinlich nur mit der Autolyse der eigenen Zelle d.h. mit den sogenannten Zytosomen zu tun hat und nichts mit der Phagozytose körperfremder Stoffe, die durch die sogenannten Phagosomen vor dich geht. In den doppelbrechenden Strukturen wurden nämlich nie Tuschepartikel gefunden.

6) Eine Verminderung der Doppelbrechung durch Hydrocortison konnte nicht festgestellt werden, jedoch vermindern Äthylalkohol und Butazolidin in höheren Dosen die Doppelbrechung sehr stark.

F - Literaturverzeichnis

1. BITENSKY, L. : The reversible activation in normal cells and the effect of pathological conditions
Lysosomes, London: Churchill 1963 362 - 375

2. BOCK, H.E. ALLNER, R. GROSS, R. : Vorteile und Nachteile der hochdosierten chemotherapeutischen Stossbehandlung von bösartigen Geschwulstbildungen
Dtsch.med.Wschr. 14, 641-646 (1967)

3. BROCK, N. HOHORST, H.J.: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus
Chemotherapie maligner Tumoren Stuttgart: Schattauer 1964 41-52

4. CARTWRIGHT, G.E. ATHENS, J.W. BOGGS,D.R. WINTROBE, M.M. : Granulopoièse chez l'homme normal
Nouv.Rev.Franc.d'Hematologie 5, 5-10 (1965)

5. CREASEY, W.A. MARKIW, M.E. Biochemical Effects of the Vinca Alkaloids - Effect of Vinblastine on Nucleic Acid Synthesis in Mouse Tumor Cells
Biochem. Pharmacol. 13 135-142 (1964)

6. COHN, Z.A. HIRSCH, J.G.: WIENER, E. The Cytoplasmic granules of Phagocytic cells and the degradation of bacteria
Lysosomes, London: Churchill 1963 126-143

7. COHN, Z.A. : Discussion Lysosomes
London: Churchill 1963 147

8. DINGLE, J.T. : Action of Vitamin A on the Stability of Lysosomes in vivo and in Vitro
Lysosomes,London: Churchill 1963 384-397

9. DOLD, U. : Wege der DPN-Synthese und ihre Beeinflussung durch alkylierende Zytostatika
Chemotherapie maligner Tumoren Stuttgart: Schattauer 1964 147-149

10. DRUCKREY, H. STEIHHOFF,B.: NAKAYANA, M. PREUSSMANN, R. ANGER, H. Beiträge zum Dosisproblem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise des Endoxans
Chemotherapie maligner Tumoren Stuttgart: Schattauer 1964 11-24

11. DE DUVE, C. : The Lysosome concept
Lysosomes, London: Churchill 1963 1-31

12. DE DUVE, C. WATTIAUX,R. WIBO, M. : Effect of fat-soluble compounds on Lysosomes in vitro
Biochem. Pharmacol 8, 30 (1961)

13. FLIEDNER, T.M. CRONKITE, E.R. : Reifung, Lebenserwartung und Schicksal neutrophiler Granulozyten
Med.Welt 10, 466-472 (1964)

14. FOLEY, G.E. FRIEDMAN,O.M. DROLET, B.P. : Studies on the mecanism of action of Cytoxan.Evidence of activation in vivo and in vitro
Cancer Res.21 57-63 (1961)

15. FREEMAN, J.A. : Cellular Fine Structure
New-York: Mc Graw Hill 1964

16. Mc GEER, P.L. Mc GEER, E.G. : Effect of amethopterin and Vincaleukoblastin on urinary 4-amino-5-imidazolecarboxamide
Biochem.Pharmacol 12, 297-298 (1963)

17. GRAUL, E.H. HUNDESHAGEN, H. : Stoffwechseluntersuchungen über 3 H und 14 C-markiertes Cyclophosphamid
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 87-94

18. GAMPE, G. : Zur Entstehung doppelbrechender Strukturen in Leukozyten
Diss. Tübingen 1966

19. HAMPEL, K.E. GERHARTZ, H. : Über die cytostatische Wirkung von Vincaleucoblastin
Verh.dtsch.Ges.Inn.Med. 68 256-258 (1962)

20. HAMPEL, K.E. GERHARTZ, H. : Zur Morphologie blockierter Mitosen der Hämopoese nach Vincaleucoblastin
Blut 10, 26-31 (1964)

21. HABERMEHL, K.O. DIEFENTHAL, W. : Untersuchungen zur Aktivierung von Endoxan in der Gewebekultur
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 53-62

22. HUNTER, J.C. : Effects of Vincaleukoblastine-sulfate on Metabolism of Thioguanine-Resistent L 1210 Leukemia Cells
Biochem.Pharmacol 12,283-291 (1963)

23. JOHNSON, J.S. ARMSTRONG, J.G, GORMAN, M. : The vinca Alkaloids: A new class of oncolytic agents
Cancer Res. 23, 1390-1427 (1963)

24. KRAHE, M. : Prüfung der zytostat.Wirkung von Endoxan in der Gewebekultur
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 63-69

25. KURZROCK, L. : Vinca rosea in der Behandlung von Haemoblastosen u. ähnlichen Krankheitsbildern
Folia haemat.8, 22-24 (1963)

26. LISS, E. : Biochemische Untersuchungen über den Einfluss des Endoxans auf die Nukleinsäuresynthese
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 133-136

27! MARTINI, E. : Increase of the cathepsin acticity of the Liver and of the Skeletal muscle of rats treated either with 2,4 dinitrophenol or with bqcterial lipopolysaccharide
Experentia 15, 182 (1959)

28. MERKER, H.J. : Struktur und Funktion der Lysosomen
Materia Medica Nordmark 1965 684-699

29. MISSMAHL, H.P. : Doppelbrechung in Leukozyten des peripheren menschl.Blutes nach supravital mit Toluidinblau
Blut 12, 149-158 (1965)

30. MISSMAHL, H.P. : mündl. Mitteilung

31. MÜLLER, D. : mündl. Mitteilung

32. NOVIKOFF, A.B. : Lysosomes in the physiology and pathology of cells: Contributions of staining methods
Lysosomes, London: Churchill 1963 36-73

33. OBRECHT, P. : Physikochemische und biochemische Veränderungen an der DNS nach Einwirkung alkylierender Substanzen
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 137-145

34. OBRECHT, P. : Vinca Alkaloids
Chemotherapy of Cancer
Amsterdam: Elsevier Publishing Company 1964 165-177

35. PALME, G. : Die Beeinflussung der DNS-Synthese durch Endoxan
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 125-131

36. RITZL, F. BOLT,W. NAHRMANN, H. : Untersuchungen mit tritiummarkiertem Endoxan! Umwandlung von Endoxan im Organismus, Gewebeaffinität und Ausscheidung von Endoxan und Endoxanabbauprodukten
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964 95-103

37. ROLL, A. MISSMAHL, H.P. : Morphologische Leukozytenveränderung bei Endoxan-Behandlung
Med.Welt 19, 1026-1029 (1965)

38. RUTMANN, R.J. : The Effect of Alkylation on DNA Synthesis in vitro
Chemotherapie maligner Tumoren
Stuttgart: Schattauer 1964
151-159

39. SCHMID, G. : Kernsegmentierung und Ausmaß der Doppelbrechung im Protoplasma neutrophiler Leukozyten des peripheren menschlichen Blutes nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau
Diss. Tübingen 1966

40. STACEY, K.A. COBB, M. COUSENS, S.F. ALEXANDER, P.: The reactions of the "radiomimetic" alkylating agents with macromolecules in Vitro
Ann.N.York Acad.Sci.68
682-701 (1958) zitiert bei(33)

41. STECHER, G. Therapie der Lymphogranulomatose mit Vincalleukoblastin
Folia haemat. 8 19-21 (1963)

42. STECHER, G.ELLERMEIER, H. BANIHASCHEMI, A. :Zytostatische Behandlung mit Vinblastine
Med.Welt 10, 519-523 (1963)

43. WEISSMANN, G. FELL, H.B. :The effect of hydrocortisone on the response of fetal rat skin in culture to ultraviolet irradation
J.Exp.Med. 116, 365-379 (1962)

44. WRIGHT, Th.L.HURLEY, J. KORST, D.R. MONTO, R.W. ROHN, R.J. WILL, J.J. LOUIS, J. :Vinblastine in neoplastic Disease
Cancer Res.23, 169-179 (1963)

A n h a n g

Verzeichnis der Patienten und Versuchspersonen

Patient Nr.1 . . .	Krankenblatt Nr. 16 698
Patient Nr.2 . . .	Krankenblatt Nr. 14 585
Patient Nr.3 . . .	Krankenblatt Nr. 17 502
Patient Nr.4 . . .	Krankenblatt Nr. 16 508
Patient Nr.5 . . .	Krankenblatt Nr. 18 680
Patient Nr.6 . . .	Krankenblatt Nr. 17 278
Patient Nr.7 . . .	Krankenblatt Nr. 17 999
Patient Nr.8 . . .	Krankenblatt Nr. 15 988
Patient Nr.9 . . .	Krankenblatt Nr. 16 166
Patient Nr.10 . . .	Krankenblatt Nr. 16 969
Patient Nr.11 . . .	Krankenblatt Nr. 16 969

Versuchsperson Nr.1 bei den Versuchen mit Endoxan: G.K. ♂
Versuchsperson Nr.2 " " " " Endoxan: W.E. ♂
Versuchsperson Nr.1 " " " " Velbe : R.L. ♂
Versuchsperson Nr.2 " " " " Velbe : H.W. ♂
Versuchsperson Nr.1 " " " " KCN : H.B. ♂
Versuchsperson Nr.2 " " " " KCN : W.E. ♂
Versuchsperson Nr.1 " " " " Tusche : G.K. ♂
Versuchsperson Nr.2 " " " " Tusche : W.M. ♂

Lebenslauf

Am 1. August 1941 wurde ich, Rainer Lemke, als Sohn des Volksschullehrers Hans Lemke und seiner Ehefrau Erna, geb. Tschimmel in Gerstetten, Kreis Heidenheim, geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Gerstetten trat ich 1952 in das Humboldt-Gymnasium Ulm ein. Dort legte ich 1961 das Abitur ab.

Im Sommersemester 1961 begann ich das Medizinstudium an der Universität Tübingen und blieb dort bis zum Physikum im Frühjahr 1964. Darauf verbrachte ich die zwei ersten klinischen Semester in Hamburg und kehrte dann nach Tübingen zurück. Am 1. August 1967 bestand ich in Tübingen das Medizinische Staatsexamen.